

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Neuhaus)

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
MYCOPHENOLAT MOFETIL AUF DIE TRANSPLANTAT-
VASKULOPATHIE NACH ALLOGENER AORTEN-
TRANSPLANTATION IM PRIMATEN-MODELL**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von:

Dr. med. Jochen Klupp
geboren am 4. Juli 1964 in Frankenthal / Pfalz

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Reichenspurner

2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Oellerich

Tag der Einreichung: 28. November 2001

Tag der Habilitation: 02. Juli 2002

Für Tina, Stephanie und Michaela.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	6
A. ORGAN - TRANSPLANTATIONEN	6
B. CHRONISCHE REJEKTION UND TRANSPLANTAT-VASKULOPATHIE	10
C. MYCOPHENOLAT MOFETIL (MMF).....	15
D. PROBLEM- UND FRAGESTELLUNG	21
II. MATERIAL UND METHODEN.....	23
A. VERSUCHSPLANUNG UND STUDIENDESIGN	23
1. Studie 101	24
2. Studie 102	26
3. Studie 201	27
4. Studie 202	28
5. Studie 301	28
B. TIERE UND TIERHALTUNG	29
1. Ratten.....	29
2. Cynomolgus Affen.....	29
C. OPERATIVE MODELLE.....	31
1. Heterotope Herztransplantation im Rattenmodell	31
2. Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell	32
3. Intravaskulärer Ultraschall (IVUS).....	35
a) Operative Durchführung	35
b) Morphometrische Analysen und Datenverarbeitung	37
D. HISTOLOGISCHE ANALYSEN.....	38
1. Heterotope Herztransplantation im Rattenmodell	38
2. Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell	39
a) Euthanasie, Transplantat Gewinnung und Präservierung.....	39
b) Histologische Färbungen und Immunhistochemie	40
c) Morphometrische Analysen	40
E. BEHANDLUNG MIT MYCOPHENOLAT MOFETIL	41
1. Ratten.....	41
2. Cynomolgus Affen.....	42
F. ANALYTISCHE METHODEN.....	42
1. Pharmakokinetik (PK) der Mycophenolsäure.....	42
2. Pharmakodynamik (PD) der Mycophenolsäure.....	43
a) Reagenzien.....	43
b) Mitogen - stimulierte Vollblut Assays	46
c) Analyse der Lymphozyten Proliferation	46
d) Analyse der Lymphozyten Oberflächen Aktivierungs-Antigene	46

e)	Analyse der intrazellulären Zytokin-Bestimmung	47
f)	Analyse der Monozyten Funktion	47
g)	Durchfluss-Zytometrische Auswertun	48
3.	<i>Hämatologische Analysen und Blutchemie</i>	52
G.	STATISTIK	52
III.	ERGEBNISSE	53
A.	STUDIE 101	53
1.	<i>Allgemeine Ergebnisse</i>	53
2.	<i>Pharmakokinetik nach eintägiger Behandlung mit MMF</i>	53
a)	MPAPlasmaspiegel	53
b)	MPAG Plasmaspiegel	55
3.	<i>Pharmakodynamik nach eintägiger Behandlung mit MMF</i>	56
a)	DNA Gehalt und PCNA Expression	56
b)	Oberflächen Antigen - Expression auf T Zellen	57
B.	STUDIE 102	57
1.	<i>Allgemeine Ergebnisse</i>	57
2.	<i>MPA Plasmaspiegel nach 6 Tagen MMF Therapie</i>	58
3.	<i>Pharmakodynamik von MMF nach wiederholten Dosierungen</i>	60
a)	DNA Gehalt und PCNA Expression	60
b)	MMF Einfluss auf Lymphozyten Aktivität	61
4.	<i>Korrelationen zwischen PK, PD und Rejektionsgrad</i>	63
C.	STUDIE 201	65
1.	<i>Allgemein</i>	65
2.	<i>MMF Toxizität im Cynomolgus Affen</i>	66
3.	<i>Pharmakokinetik nach oraler Gabe von MMF</i>	67
4.	<i>Pharmakodynamik nach oraler QD Gabe von MMF</i>	69
D.	STUDIE 202	71
1.	<i>Allgemein</i>	71
2.	<i>Pharmakokinetik nach subkutaner MMF BID Applikation</i>	71
3.	<i>Toxizität nach subkutaner MMF Applikation</i>	73
4.	<i>Pharmakokinetik nach oraler Gabe von CellCept-IV®</i>	74
E.	STUDIE 301	75
1.	<i>Allgemeine Daten und perioperativer Verlauf</i>	75
2.	<i>MMF Therapie und ihre spezifischen Komplikationen</i>	78
3.	<i>Pharmakokinetische Untersuchungen</i>	83
4.	<i>Pharmakodynamische Untersuchungen</i>	84
a)	In vitro	84
b)	In vivo	87
5.	<i>IVUS – Morphometrie</i>	91
a)	Gefäßvolumina	91
b)	Lumenvolumina	92

c) Intimavolumina	94
6. <i>Histologische Untersuchungen</i>	97
a) Qualitative Auswertung	97
b) Morphometrische Messungen	101
7. <i>Korrelationen zwischen Dosis, PK, PD und Intimahyperplasie</i>	102
IV. DISKUSSION	106
A. BISHERRIGE EXPERIMENTELLE ARBEITEN	106
1. <i>Einfluss von MMF auf die Transplantat-Vaskulopathie</i>	106
2. <i>Aortentransplantationsmodell im Primaten</i>	110
3. <i>MMF Pharmakokinetik und Toxizität im Primaten</i>	111
B. OPTIMIERUNG DER TIER-EXPERIMENTELLEN MMF GABE	112
C. EINFLUSS VON MMF AUF DIE TRANSPLANTAT-VASKULOPATHIE IM PRIMATEN	118
1. <i>Aortenmodell und TVP in der Kontrollgruppe</i>	118
2. <i>Toxizität, PK und PD in der MMF Gruppe</i>	119
3. <i>Effekt der MMF Therapie ab Tag 45 nach Transplantation</i>	122
4. <i>Inter-individuelle Unterschiede in der MMF Wirksamkeit</i>	123
D. SCHLUßFOLGERUNGEN	125
V. ZUSAMMENFASSUNG	127
VI. LITERATURVERZEICHNIS	129
VII. ANHANG	148
A. ABKÜRZUNGEN	148
B. LISTE DER TABELLEN	151
C. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	152
D. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	157
E. LEBENSLAUF	158
F. DANKSAGUNG	162

I. EINLEITUNG

A. Organ - Transplantationen

Im 12. Jahrhundert v. Chr. transplantierte ein Hindu-Gott einen Elefantenkopf auf einen Jungen, den er zuvor ungerechtfertigt geköpft hatte (O'Flaherty, 1975). Pien Ch'iao (um 300 v. Chr.), tauschte die Herzen zweier Männer, um ihre Energien zu vereinen (Wong und Lien-The, 1973; Kahan, 1988) und St. Cosmas und St. Damian, syrische Heiler, Patrone der Ärzte, Chirurgen und Märtyrer der christlichen Kirche (hingerichtet am 27. September 287), amputierten ein gangränöses Bein und ersetzten dieses durch das Bein eines kurz zuvor verstorbenen Mohren (Kahan, 1983).



Abbildung 1: St. Cosmas und St. Damian praktizierten die Kunst des Heilens im Hafen Aegea, heute Ayasb (Türkei). Das Wunder des schwarzen Beines beschreibt die erfolgreiche Transplantation eines Beines von einem äthiopischen Mohren auf den Römer Justinian, der seine Extremität aufgrund eines Gangrüns oder einer Geschwulst verlor. Der Legende nach konnte der Mann bereits am nächsten Tag zum Grab des Mohren laufen

Legenden wie diese ziehen sich durch die Geschichte der Medizin aller Kulturen und demonstrieren die Faszination, Organe oder Körperteile zu ersetzen, um Erkrankungen zu heilen. Aber erst die Entwicklung geeigneter chirurgischer Techniken, wie die Gefäßnaht (Carrel, 1914), die Konservierung des Spenderorgans (Belzer et al., 1967), und das zunehmende Verständnis der Transplantationsimmunologie (Landsteiner, 1931; Gibson und Medawar, 1942; Medawar, 1944; Dausset, 1958; Hamburger et al., 1959) ebneten den Weg für die klinische Organtransplantation.

Die erste Leichen-Nierentransplantation erfolgte 1933 (Hamilton und Reid, 1984) und ohne immunologisches Wissen wurde das Transplantat innerhalb von 2 Tagen abgestoßen. Erst 1954 wurde die erste erfolgreiche humane Nierentransplantation durchgeführt (Murray et al., 1955), wobei Murray hier noch die immunologische Barriere durch eine Isotransplantation umging. Er führte auch die erste erfolgreiche humane Allotransplantation zwischen zwei nicht-identischen Zwillingen nach Ganzkörper-Bestrahlung des Empfängers durch (Merrill et al., 1960; Murray et al., 1960).

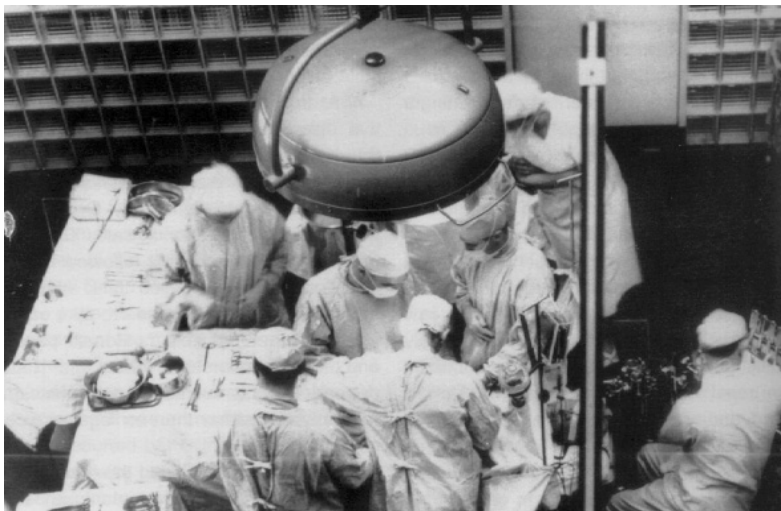


Abbildung 2: Joseph E. Murray führt am 23.12.1954 in Boston die erste erfolgreiche Nierentransplantation durch.

Allerdings hatte die Bestrahlung erhebliche Nebenwirkungen und viele Empfänger verstarben an fulminanten Infektionen. Erst die Einführung von 6-Mercaptopurin bzw. Azathioprin (Schwartz und Dameshek, 1959; Küss et al., 1962), das in Kombination mit Steroiden und später mit Antilymphozyten-Präparaten (Starzl et al., 1969) eingesetzt

wurde, ermöglichte eine Transplantation auch zwischen nicht unmittelbar Verwandten. Der Einsatz dieser Immunsuppressiva, die Entdeckung des HLA-Systems (Dausset, 1958), die Entwicklung von Konservierungslösungen (Belzer et al., 1967; Brettschneider et al., 1968) und die ethische Akzeptanz des Hirntodes, ermöglichte schließlich die Leichenspende und somit die Ausweitung der Transplantationsmedizin auf andere Organsysteme. So führte Thomas E. Starzl am 23. Juli 1967 die erste erfolgreiche Lebertransplantation durch (Starzl et al., 1967), nachdem frühe Versuche 1963 scheiterten. Nach Vorarbeiten von Norman E. Shumway (Shumway et al., 1967b; Shumway et al., 1967a) erfolgte im Dezember 1967 die erste Herztransplantation (Barnard, 1967).

Die frühen Jahre der Organtransplantation waren durch eine hohe operative Mortalität, eine hohe Inzidenz von akuten Rejektionen und schwer beherrschbare Nebenwirkungen der Immunsuppressiva gekennzeichnet. Eine neue Ära begann 1978, als Ciclosporin (CsA) erstmals klinisch nach Nierentransplantation eingesetzt wurde (Borel et al., 1976; Calne et al., 1978a; Calne et al., 1978b). Im Gegensatz zu Azathioprin und Steroiden weist CsA nicht nur eine höhere Effektivität auf, sondern wirkt zudem spezifischer auf T - Lymphozyten. Hierdurch konnten gleichzeitig Rejektionsraten und Infektionsraten gesenkt werden. Somit verlängerte sich das Patienten- und Transplantatüberleben und die Transplantation setzte sich als Standardtherapie für viele terminale Organversagen durch. Neue Generationen von Immunsuppressiva, wie Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Sirolimus und spezifische Antikörperpräparate, haben die Therapie nach Transplantation weiter verfeinert und die Überlebensraten noch weiter verbessert.

Von der UNOS Registry werden 5-Jahresüberlebensraten nach Nieren-, Herz- und Lebertransplantation von 81,8%, 69,8% und 74,2% angegeben (UNOS, 1999). In erfahrenen Zentren werden diese Zahlen noch übertroffen: So zeigen die Daten nach Lebertransplantation aus Pittsburgh (Jain et al., 2000) eine aktuarische 18-Jahresüberlebensrate von 48% und im eigenen Zentrum werden nach Lebertransplantation 5- und 10-Jahresüberlebensraten von 83,6% bzw. 75,7% erreicht (Abbildung 3). Wie beschrieben werden diese guten Überlebensdaten vor allem durch die geringe perioperative Morbidität und die Beherrschbarkeit der akuten Rejektionen bedingt. Somit steht heute das Organversagen im späten Verlauf nach Transplantation in den Mittelpunkt des Interesses.

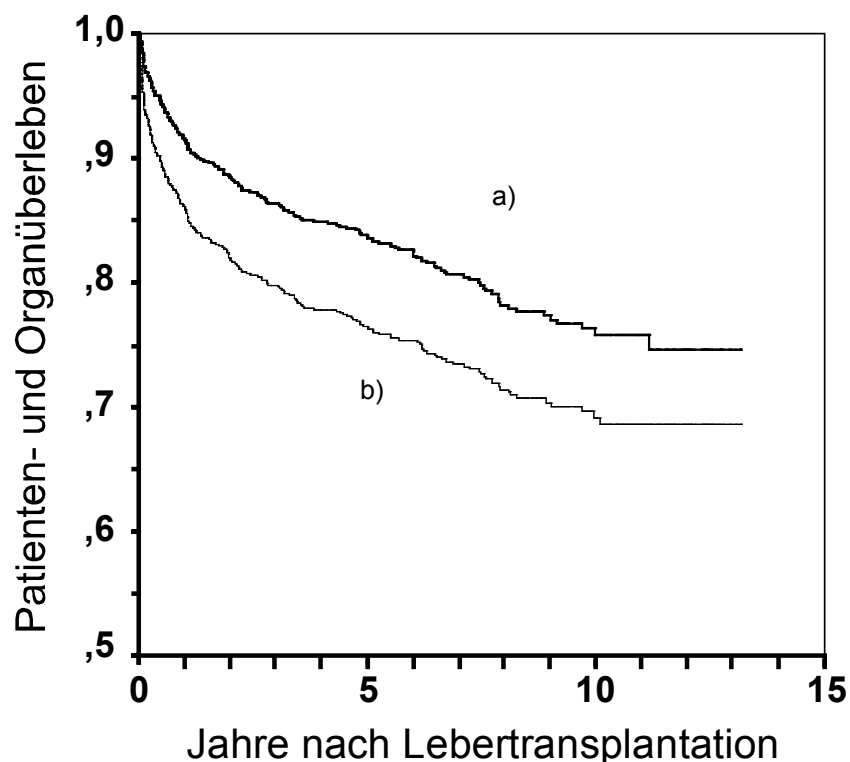


Abbildung 3: Patienten- (a) und Organüberleben (b) nach Lebertransplantation an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Charité – Campus Virchow von 1988 bis heute.

B. Chronische Rejektion und Transplantat-Vaskulopathie

Nachdem heute die immunsuppressive Therapie weitgehend in der Lage ist, akute Abstoßungsepisoden zu vermeiden oder sicher zu behandeln, steht nun die chronische Transplantat-Dysfunktion im Mittelpunkt des Interesses. Die Hauptursache hierfür ist, neben dem Rezidiv der Grunderkrankung und den unerwünschten Wirkungen von Immunsuppressiva auf das Transplantat, die chronische Rejektion. Die progressive Zerstörung der Organintegrität wird hierbei vor allem durch eine alloantigen-abhängige Immunreaktion hervorgerufen und führt zu einer zunehmenden Verschlechterung der Transplantatfunktion und letztendlich zum Transplantatversagen. Zeitpunkt des Auftretens und Verlauf der Erkrankung sind hierbei sehr variabel: Chronische Rejektionen treten innerhalb von wenigen Monaten bis zu mehreren Jahren nach Transplantation auf und können einerseits rasch progredient zum Transplantatverlust führen, oder andererseits für einen langen Zeitraum mit einer stabilen Transplantatfunktion vergesellschaftet sein.

Die pathologischen Veränderungen der chronischen Rejektion nach Nierentransplantation sind bekannt und in den BANFF Konferenzen definiert worden (Solez et al., 1993; Solez, 1994; Racusen et al., 1999). Es wird angenommen, dass die chronische Rejektion mit einer obliterativen Endarteriitis oder Capillaritis der Glomeruli beginnt. (Sibley, 1994). Die Transplantat-Vaskulopathie (TVP) wird durch die Lumeneinengung der Arterien und Arteriolen charakterisiert. Typische Veränderungen sind hierbei die Intima Verdickung mit nur wenigen Brüchen der Membrana elastica interna und einer weitgehend intakten Media. Diese Veränderungen treten zunächst nur fokal im Transplantat auf, was eine frühe Diagnose durch Biopsien erschwert. Die TVP ist beweisend für die chronische Rejektion nach Nierentransplantation, kann aber aus den genannten Gründen nur in ca. 5% der Biopsien in Patienten mit chronischer Rejektion nachgewiesen werden (Solez, 1994). Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie treten im späteren Verlauf generalisierter auf und sind dann konstanter nachzuweisen.

Die Transplantat-Vaskulopathie ist ebenfalls ein typisches Zeichen der chronischen Rejektion nach Lebertransplantation. Schaumzellbildungen im Endothel der Arterien und

Arteriolen sind neben den Gallenwegsveränderungen pathognomonisch. Wie auch nach Nierentransplantation versagt die Feinnadel-Biopsie oftmals beim Nachweis früher Veränderungen der chronischen Rejektion, da die Vaskulopathie zunächst in den größeren Arterien beginnt. Frühe Anzeichen in der Biopsie sind dagegen lobäre Infiltrate, eosinophile Transformationen und Verlust des Gallenepithels und letztendlich das Verschwinden der portalen Gallenwege. Sind in mehr als 50% der untersuchten Portalfelder Gallengänge nicht mehr nachweisbar, so spricht man von einem „vanishing bile duct syndrom“ (VBDS), dem Schlüsselbefund für den Nachweis einer chronischen Rejektion (Wiesner, 1994; Batts, 1999; Demetris et al., 2000).

Nach Herztransplantation ist die Transplantat-Vaskulopathie (TVP) das primäre Zeichen einer chronischen Rejektion. Ca. 5-10% der Herztransplantat-Empfänger erkranken jährlich an TVP, die somit die führende Todesursache im Langzeitverlauf nach Herztransplantation ist (Uretsky et al., 1987; Billingham, 1994; Weis und von Scheidt, 1997). So wird von einer 1, 2 und 4 Jahres-Inzidenz von 11%, 22% und 45% berichtet (Costanzo et al., 1998). Histologisch unterscheidet sich die TVP von einer primären Arteriosklerose durch die konzentrisch auftretende Myointimaproliferation. Ferner sind die Arterien in ihrer gesamten Länge unter diffuser Einbeziehung der kleinen Seitenäste betroffen. Arteriosklerotische Veränderungen sind dagegen durch exzentrische, fokale Läsionen gekennzeichnet, die vor allem proximal in den großen Koronarien auftreten (Billingham, 1994; Ventura et al., 1995). Beide Erkrankungen des Gefäßsystems führen letztendlich zu einem Gefäßverschluss und somit zu einem Myokardinfarkt.

Immunologische und nicht immunologische Risikofaktoren korrelieren mit dem Auftreten einer Transplantat-Vaskulopathie: Hierbei scheinen vor allem Anzahl und Schwere einer akuten Rejektion mit der TVP zu korrelieren (Uretsky et al., 1987; Billingham, 1994; Fellstrom et al., 1999). Nicht immunologische Faktoren, wie virale Infektionen (CMV, HCV; (Dal Bello et al., 1998)), Ischämie-Reperfusionsschäden, metabolische

Störungen (Hyperlipidämie, Adipositas), aber auch mechanische Schäden durch Manipulationen oder durch Hypertension haben zumindest einen modulatorischen Einfluss auf die Entwicklung der TVP (Abbildung 4). Spender-spezifische Risikofaktoren

sind Alter, männliches Geschlecht und präexistente Arteriosklerose (Costanzo et al., 1998).

Pathophysiologisch kommt es zunächst zu einer allogen-abhängigen oder unabhängigen Aktivierung des Immunsystems mit einer Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die Gefäßwand. Diese frühe Phase ist demnach durch eine Expression von Interleukin-1 (IL-1), Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) und dem IL-2 Rezeptor (CD25) charakterisiert. Weiterhin kommt es zu einer HLA MHC-II Hochregulation und zu einer zunehmenden Expression von Adhensionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) an den Endothelien, sodass vermehrt T Zellen in Kontakt mit dem Endothel treten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Abnahme der Stickstoffmonoxid-Produktion (NO = EDRF; Endothelial Derived Relaxing Factor) im Endothelium und zu einer zunehmenden Sauerstoff- und Hydroxyl-Radikalbildung. Vasoaktive Peptide (ET-1; Angiotensin II, TxB2) verstärken die Vasokonstriktion. Die Überexpression von Rezeptoren für oxidiertes LDL auf Makrophagen führt zu einer intrazellulären Cholesterol Deposition und Schaumzellbildung. Später nehmen Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF β und bFGF zu und es kommt zu einer vermehrten Infiltration und Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) und von Fibroblasten. Das Endstadium ist von T Helfer Zellen 2 (Th2) -Zytokinen (IL-4, IL-10, TGF β) dominiert, und von einer zunehmenden Formation und Deposition extrazellulärer Matrix und interstitieller Fibrose charakterisiert (Abbildung 4)

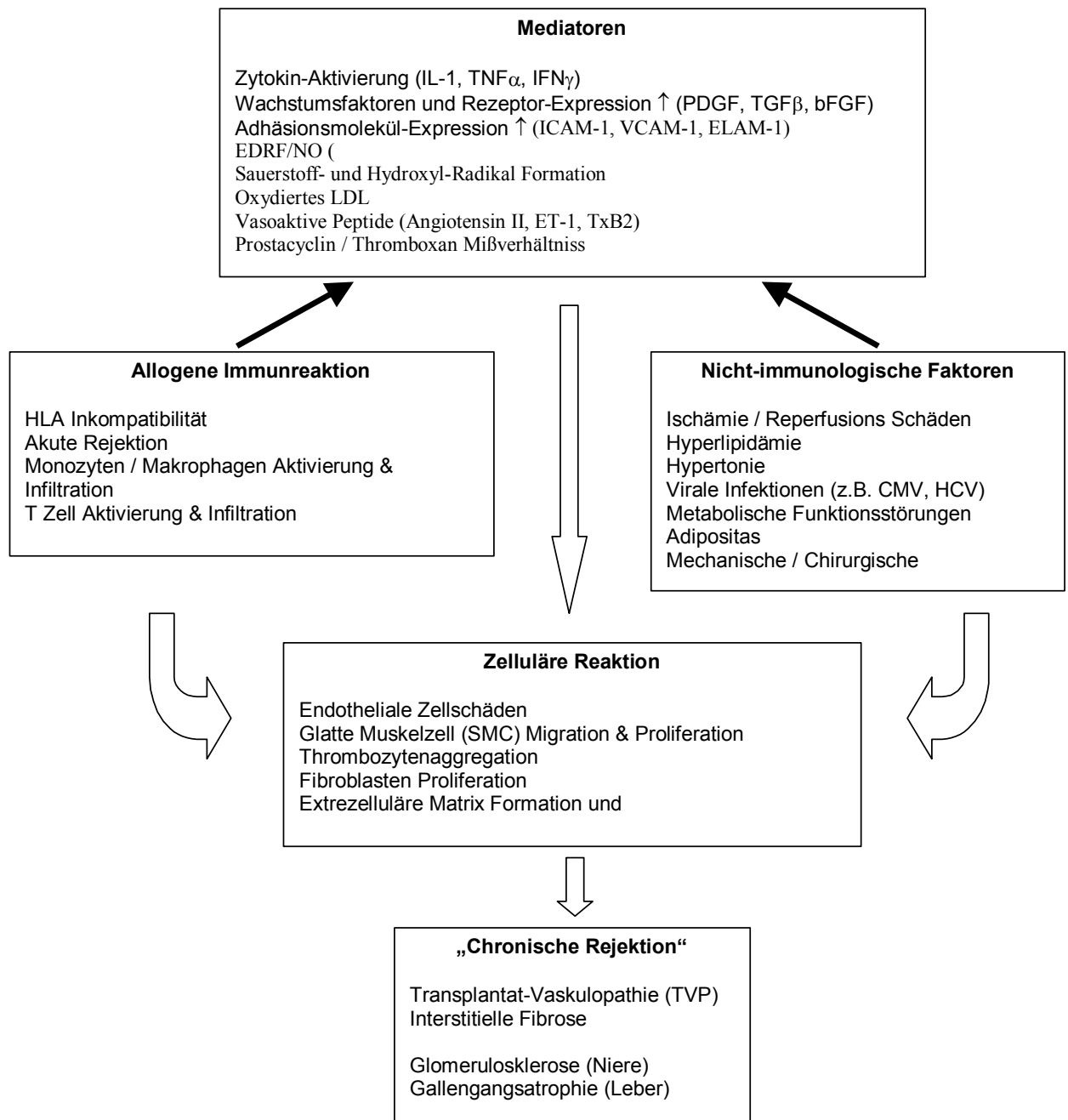


Abbildung 4: Risikofaktoren, Pathogenese und Mediatoren der chronischen Rejektion (modifiziert nach Fellstrom et al., 1999). Abkürzungen siehe Text

Die klinische Diagnose der TVP nach Herztransplantation wird durch die Denervation des Herzens erschwert: Anzeichen einer Angina Pectoris fehlen fast immer und die TVP bleibt oft bis zum Einsetzen einer Herzinsuffizienz, oder auch bis zum plötzlichen Herztod symptomfrei. Nicht-invasive Verfahren zur Diagnose der TVP beinhalten die Dobutamin-Stress-Echokardiographie und die Volumen-Belastung zur frühen Aufdeckung einer hämodynamischen Dysfunktion. Diese sehr sensitiven Verfahren zeigen frühe Veränderungen schon in Patienten, bei denen die Koronarangiographie noch ein normales Gefäßsystem darstellt (Pahl et al., 1995; Larsen et al., 1998). Ist die Erkrankung bereits in der Koronarangiographie erkennbar, so weist dieses auf ein fortgeschrittenes Stadium mit einer schlechten Prognose hin (Costanzo et al., 1998). Eine höhere Sensitivität (88% im Vergleich zu 15% für die Koronarangiographie) weist die intravaskuläre Ultraschall Untersuchung (IVUS) auf: Intima Verdickungen von weniger als 0.3 mm können bereits entdeckt werden. (Rickenbacher et al., 1996).

Dagegen kann die Diagnose einer chronischen Rejektion nicht sicher mit einer Endomyokard-Biopsie gestellt werden, da die TVP vor allem Arterien und erst später Arteriolen befällt. Subendokardiale Infarkte und Fibrose sind jedoch indirekte Zeichen eines koronaren Problems (Billingham, 1994; Pardo et al., 1997). Typische Veränderungen der Transplantat-Vaskulopathie werden oftmals erst in der Autopsie gesehen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die chronische Rejektion heute in allen Organsystemen eines der wichtigsten ungelösten Probleme nach Transplantation darstellt. Die Calcineurin-Antagonisten konnten zwar die Inzidenz der akuten Rejektion drastisch vermindern, die Inzidenz der Transplantat-Vaskulopathie und die Organüberlebenszeit im Langzeitverlauf wurden hierdurch aber nur unwesentlich beeinflusst. Somit sind neue Klassen von Immunsuppressiva notwendig, die mit differenzierten Wirkungsweisen die für das Entstehen der chronischen Rejektion spezifischen Pathomechanismen unterbrechen können. Durch wirksame Prävention und Therapie der chronischen Rejektion bzw. der Transplantat-Vaskulopathie wäre es dann möglich eine optimale Transplantatfunktion über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten.

C. Mycophenolat Mofetil (MMF)

Mycophenolat Mofetil (MMF; $C_{23}H_{31}NO_7$; Molekulargewicht 433.51), ein biologisch inaktiver Morpholino-Ethylester der aktiven Wirksubstanz Mycophenolsäure (MPA), wurde mit dem Ziel entwickelt, die pharmakokinetischen Eigenschaften von MPA zu verbessern (Allison und Eugui, 1993b). Der chemische Name lautet 2-(4-morpholino)ethyl-(E)-6-(1,3-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-4-methyl-4-hexenoat (Abbildung 5).

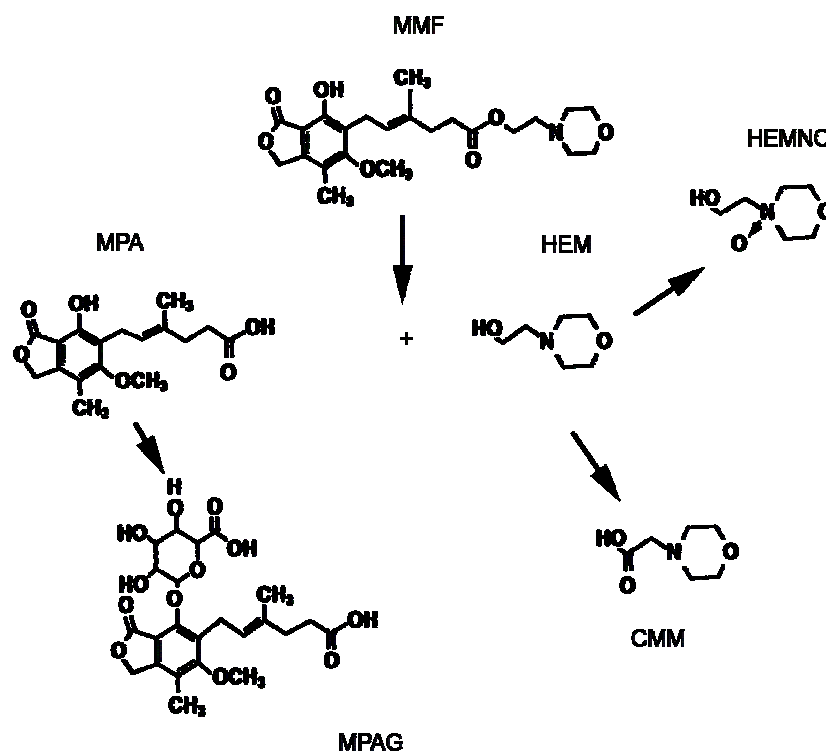


Abbildung 5: Metabolismus von Mycophenolat Mofetil (MMF). MMF, biologisch inaktiv, wird rasch und vollständig zur aktiven Wirksubstanz Mycophenolsäure (MPA) hydrolysiert. Der Abbauprozess erfolgt durch Glucuronisierung zu MPAG (Mycophenolat-Glucuronid). Die Morpholingrouppe von MMF ist biologisch inaktiv und wird als Hydroxyethyl-Morpholin (HEM), Hydroxyethyl-Morpholin N-oxid (HEMNO) und Carboxymethyl-Morpholin (CMM) hauptsächlich über den Urin ausgeschieden.

Nach oraler Gabe wird MMF rasch und vollständig (Bioverfügbarkeit: 100%) absorbiert und schon in der Darmmukosa und während der ersten Leberpassage zu MPA hydrolysiert, so dass in der Regel keine MMF-Spiegel im peripheren Plasma nachweisbar sind.

Nach einer Gabe von 1.5 g MMF (CellCept[®]) werden MPA-Spitzenspiegel innerhalb von einer Stunde erreicht (C_{\max} : $32,8 \pm 8,2$ mg/l; t_{\max} : $0,9 \pm 0,4$ h; AUC_{0-12h} : $51,5 \pm 15,1$ mg/l*h; (Bullingham et al., 1998)). Die Metabolisierung (Abbildung 5) (Bullingham et al., 1996a; Bullingham et al., 1996b) geschieht in der Leber, der Darmmukosa und z.T. auch in anderen Geweben durch Glucuronisierung von MPA zu MPAG (Mycophenolat-Glucuronidat), dessen Spitzenspiegel (C_{\max} : $4338 \pm 13,1$ mg/l) nur unwesentlich verzögert auftreten (t_{\max} : $1,7 \pm 0,5$ h). MPAG erfährt nach Exkretion über die Galle einen enterohepatischen Kreislauf, wird von der Darmflora wieder deglucuronidiert und als MPA reabsorbiert. Dies erklärt die zweigipflige Plasmakonzentrationskurve mit einem zweiten Peak nach 6 – 12 Stunden nach Medikamentengabe. Radioaktiv markiertes ¹⁴C - MMF zeigt eine Plasma-Halbwertszeit von 17,6 Stunden und innerhalb von 72 Stunden nach Administration werden 90,6% der Radioaktivität wieder ausgeschieden. Überwiegend erfolgt die Ausscheidung als MPAG (96,3%) über die Nieren und nur zu einem geringen Anteil über den Stuhl. MMF wird dagegen als Ausscheidungsprodukt nicht entdeckt und nur 0,6% der Exkretionsmenge erscheint als MPA und 0,3% als Acylglucuronid-Konjugat von MPA. (Bullingham et al., 1998). Die Morpholingroupen von MMF ist biologisch inaktiv und wird als Hydroxyethyl-Morpholin (HEM), Hydroxyethyl-Morpholin N-oxid (HEMNO), Carboxymethyl-Morpholin (CMM) und zu 2,7% als noch nicht identifizierte Metabolite hauptsächlich renal eliminiert. Pharmakologisch aktive Metabolite sind kürzlich isoliert worden, allerdings ist deren klinische Bedeutung noch unklar (Schütz et al., 1999).

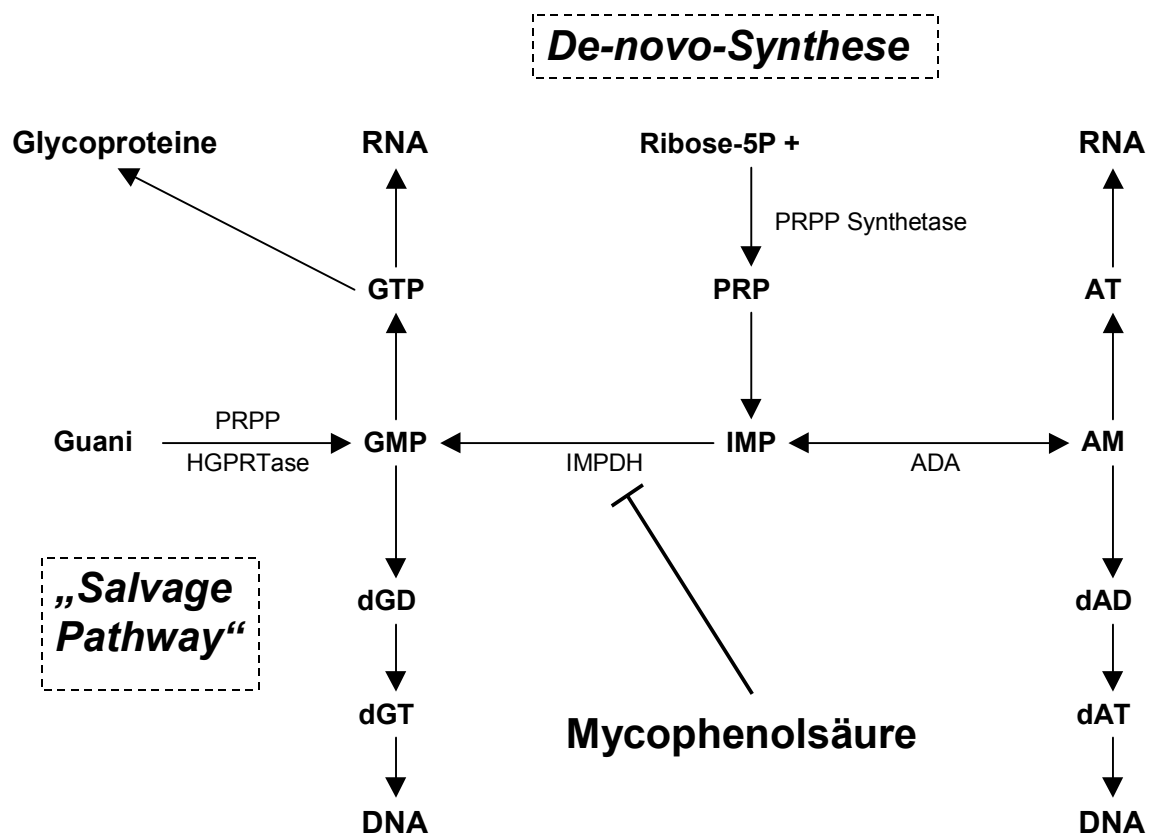


Abbildung 6: Verschiedene Synthesewege des Purinmetabolismus. Da der Wiederverwertungs-Stoffwechsel („Salvage-Pathway“) zur Herstellung von Guanosinmonophosphat in aktivierten Lymphozyten nicht ausreicht, sind diese Zellen von der de-novo-Synthese abhängig. MPA hemmt hierbei das Schlüsselenzym IMPDH und ist somit ein Lymphozyten-spezifisches Immunsuppressivum. (PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat; IMP: Inosinmonophosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintri-phosphat; ADA: Adenosin Deaminase; dATP: Deoxyadenosintri-phosphat; IMPDH: Inosinmonophosphat-Dehydrogenase; GMP: Guanosinmonophosphat; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintri-phosphat; HGPRTase: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase). (Modifiziert nach Allison und Eugui, 1994).

Mycophenolsäure als aktive Substanz von MMF ist ein Fermentationsprodukt von *Penicillium stoloniferum* und wurde bereits 1896 durch Gosio (Gosio, 1896) bei den Untersuchungen an verdorbenem Mais isoliert. Die initialen Studien (Brewin et al., 1972) konzentrierten sich auf die antiproliferativen und zytostatischen Eigenschaften von MPA. Klinische Studien zur Therapie der Psoriasis (Epinette et al., 1987) und fortgeschrittenen malignen Tumoren wurden durchgeführt. Weitere präklinische Untersuchungen zeigten, dass die zytostatischen Effekte von MPA sehr selektiv für Lymphozyten sind, und dass MPA ein nicht kompetitiver und reversibler Antagonist beider Isoformen der

Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) ist (Allison et al., 1993; Allison und Eugui, 1994; Hager et al., 1995). IMPDH ist ein Schlüsselenzym für die *de-novo*-Synthese von Purinnucleotiden (Abbildung 6). Während die meisten Zellen und ebenfalls ruhende Lymphozyten in der Lage sind ihren Guanosin-Mono-Phosphat (GMP) Bedarf mittels der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRTase) aus Guanin zu decken (Wiederverwertungs-Stoffwechsel; *Salvage-Pathway*), sind aktivierte Lymphozyten von der GMP Neuproduktion aus Inosin-Monophosphat (IMP) (*de-novo*-Synthese) (Allison und Eugui, 1994) und somit IMPDH abhängig. Aber auch andere Zellen, wie glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und intestinale Epithelzellen sind teilweise von der *de-novo*-Purinsynthese abhängig. Die Hemmung von IMPDH führt zu einer Verminderung der GMP, GDP und GTP Produktion und somit zu einer Hemmung der DNA und RNA Produktion. Hieraus resultiert eine Verminderung der Glykoprotein-Synthese und eine Proliferationshemmung der Zellen im Übergang der G₁ zur S Phase des Zellzyklus.

In vitro hemmte MPA die Proliferation von mononucleären Zellen nach Phytohemagglutinin (PHA; T Zell-Mitogen), Pokeweed Mitogen (PWM; T Zell abhängiges B Zell Mitogen) und nach Staphylococcus Protein A Sepharose (B Zell Superantigen) Stimulierung (Eugui et al., 1991; Allison und Eugui, 1993b; Allison und Eugui, 1993a; Allison und Eugui, 1994). Die IC₅₀ lag in allen Versuchen unter 100 nM, einer Konzentration in der MPA keinen Effekt auf Endothelzellen, Fibroblasten oder andere Zellen hat. Glatte Muskelzellen, im wesentlich verantwortlich für die Entstehung der Transplantat-Vaskulopathie wurden in einer Konzentration von 1 – 10 µM in ihrer Proliferation gehemmt (Allison und Eugui, 1994). Im Gegensatz zu Ciclosporin und Tacrolimus hatte MPA keinen Effekt auf die Interleukin 2 (IL-2) Produktion in aktivierten T Zellen. Auch andere Lymphokine, Chemokine oder andere Wachstumsfaktoren wurden nicht von MPA in ihrer Produktion gehemmt. Dagegen führte MPA über eine Reduktion von GTP und der damit verminderten Produktion von Glykoproteinen (Allison und Eugui, 1994) zu einer herab gesetzten Expression von Adhesionsmolekülen (CD 11a, CD 54) an der Zelloberfläche. Diese Effekte konnten auch an anderen Zelloberflächen-Molekülen, wie dem IL-2 Rezeptor (CD 25), T Zell-Aktivierungsmarker (CD 71, CD 134, CD 154) sowie Apoptosemarkern (CD 90)

beobachtet werden (Gummert et al., 1999a; Klupp et al., 2000; van Gelder et al., 2000; Barten et al., 2001; Klupp et al., 2001b; van Gelder et al., in preparation; Klupp et al., submitted-a).

In vivo wurden die ersten erfolgreichen Versuche, welche die immunsuppressive Wirkung von MMF belegten, in einem heterotopen Herztransplantations-Modell in der Ratte durchgeführt (Morris et al., 1989; Morris et al., 1990). Unter der Gabe von 40 mg/kg KG/Tag trat keine Transplantat-Abstoßung auf. Im gleichen Modell zeigte die Kombination von 0.75mg/kg KG/Tag Ciclosporin (CsA) und 10 mg/kg KG/Tag MMF einen zumindest additiven Effekt mit einer Überlebenszeit des Transplantates von mehr als 50 Tagen. Im Primaten-Modell verlängerte MMF in einer Dosis zwischen 70 und 175 mg/kg KG/Tag das Transplantatüberleben auf 19 bis 62 Tagen im Vergleich zu 9 Tagen in der Kontrollgruppe (Morris et al., 1991). Auch in anderen Tiermodellen zeigte sich MMF als wirksames Immunsuppressivum nach Nieren- (Azuma et al., 1995; Vu et al., 1998), Pankreas- (Qi et al., 1996; Vu et al., 1998), Leber- (Platz et al., 1991a; Platz et al., 1991b; Platz et al., 1991c; Bechstein et al., 1993), und Darmtransplantation (D'Alessandro et al., 1993).

Erste klinische Phase I Studien erfolgten 1992 (Sollinger et al., 1992) und zeigten, dass MMF bis zu 3500 mg/Tag gut toleriert wurde. Typische Nebenwirkungen umfaßten gastrointestinale Störungen (Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle) und Knochenmarkssuppressionen. In zahlreichen nachfolgenden klinischen Studien wurde die Sicherheit und Wirksamkeit von MMF zur Prävention von akuten Abstoßungsreaktionen bewiesen. Nach Nierentransplantation zeigte sich die Dosis von 2-3 g MMF/Tag in Kombination mit CsA und Steroiden der Gabe von Placebo bzw. der Gabe von 1-2 mg/kg KG/Tag Azathioprin überlegen und reduzierte die Inzidenz von akuten Rejektionen auf 13 – 19% in den ersten 6 Monaten nach Transplantation (European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group, 1995; Sollinger, 1995). Auch nach Herz- (Kirklin et al., 1994; Taylor et al., 1994; Kobashigawa et al., 1998), Leber- (McDiarmid, 1996; Klupp et al., 1997; Eckhoff et al., 1998; Jain et al., 1998; Hebert et al., 1999; Klupp et al., 1999; Glanemann et al., 2000; Glanemann et al., 2001; Wiesner et al., 2001), Pankreas- (Stratta, 1997; Gruessner et al., 1998; Odorico et al., 1998; Odorico et al.,

1999; Merion et al., 2000; Kahl et al., 2001) und Dünndarmtransplantation (Weppler et al., 1996) zeigte sich MMF klinisch erfolgreich.

Parallel zur Entwicklung von MMF zur Prävention und Therapie von akuten Rejektionen wurde die Wirksamkeit dieses Immunsuppressivums auf die Transplantat-Vaskulopathie untersucht: Hierbei zeigte sich, dass MMF *in vitro* die Proliferation der glatten Muskelzellen hemmt (Raisanen-Sokolowski et al., 1995b; Mohacsi et al., 1997) und dass MMF in verschiedenen Kleintiermodellen in der Lage war, die Intima Proliferation zu verhindern (Steele et al., 1993; Fraser-Smith et al., 1995; Gregory et al., 1995). Allerdings waren hierzu hohe Dosen notwendig und z. T. konnte MMF diesen Effekt nicht über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten (Raisanen-Sokolowski et al., 1994).

Es liegen nur beschränkte klinische Daten vor, die den Einfluss von MMF auf die chronische Transplantat-Abstoßung untersuchten. Nach Nierentransplantation sind die Ergebnisse uneinheitlich (Di et al., 2000) und so gibt es Berichte die für (Jirasiritham et al., 1998; Campistol et al., 1999; Ferraris et al., 2000) aber auch gegen (Glicklich et al., 1998) eine Wirksamkeit von MMF auf die chronische Transplantat-Dysfunktion sprechen. Nach Lebertransplantation zeigten erste Erfahrungen, dass unter MMF Therapie chronische Rejektionen einen günstigeren klinischen Verlauf haben (Klupp et al., 1997; Kato et al., 1999). Nach Herztransplantation liegen bisher nur präliminäre Ergebnisse vor (Kobashigawa, 1998; Orbaek, 1999).

D. Problem- und Fragestellung

Aus den bisher dargestellten Untersuchungen ergibt sich die Frage, ob Mycophenolat Mofetil eine chronische Rejektion nach Allotransplantation behandeln kann. Da die chronische Rejektion jedoch kein homogenes Krankheitsbild ist und sich in den verschiedenen Organsystemen unterschiedlich darstellt, konzentriert sich folgende Untersuchung auf die Behandlungsmöglichkeit der Transplantat-Vaskulopathie. Diese ist nicht nur ein wesentliches Merkmal der chronischen Rejektion nach Herz-, Nieren- und Lebertransplantation, sondern bietet auch experimentell gut messbare Parameter. Zur Evaluation des Medikamenteneffektes von MMF auf die TVP wurde ein etabliertes Tiermodell gewählt (Gummert et al., 1998; Ikonen et al., 2000a): Im Primaten wird ein infrarenales Segment der Aorta allogren transplantiert und ohne jegliche Immunsuppression entwickelt sich nachfolgend eine manifeste Intimahyperplasie. Die Vorteile dieses Primaten-Modells liegen darin, dass die Gefäßveränderungen den klinischen histomorphologischen Veränderungen beim Menschen direkt entsprechen. Weiterhin besteht in diesem Modell die Möglichkeit, die sich entwickelnde Erkrankung mittels intravaskulärem Ultraschall (IVUS) im Verlauf zu beobachten.

Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob MMF eine bereits etablierte Immunantwort unterbrechen könne (Therapiestudie). Hierzu sollten die Tiere zunächst für 6 Wochen nach Transplantation keinerlei Immunsuppression erhalten, damit sich eine TVP etablieren konnte und erst danach sollte mit der MMF Monotherapie begonnen werden. Primärer Endpunkt der Studie war die sich entwickelnde Intimahyperplasie. Diese sollte morphometrisch im IVUS und in der Histologie gemessen werden. Sekundäre Endpunkte waren Flächen- bzw. Volumenmessungen des Gefäßlumens und der Media, sowie Korrelationen zwischen MMF-Gabe, MMF-Pharmakokinetik (PK) und -Pharmakodynamik (PD) einerseits und den morphometrischen Bestimmungen andererseits.

In Voruntersuchungen sollte die MMF Gabe optimiert werden. Ziel dieser Untersuchungen, die teils im Ratten- und teils im Primatenmodell durchgeführt wurden, war es eine MMF Dosierung zu finden, die nahe der maximal tolerierten Dosis liegt (MTD). Optimale MMF Dosen, Dosierungsintervalle und Administrationswege für den Primatenversuch waren zu finden. Bestimmt wurden pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter, deren Korrelation zur immunsuppressiven Wirkung in einem heterotopen Herztransplantations-Modell in der Ratte, sowie toxische Effekte der MMF Therapie im Primaten.

II. MATERIAL UND METHODEN

A. Versuchsplanung und Studiendesign

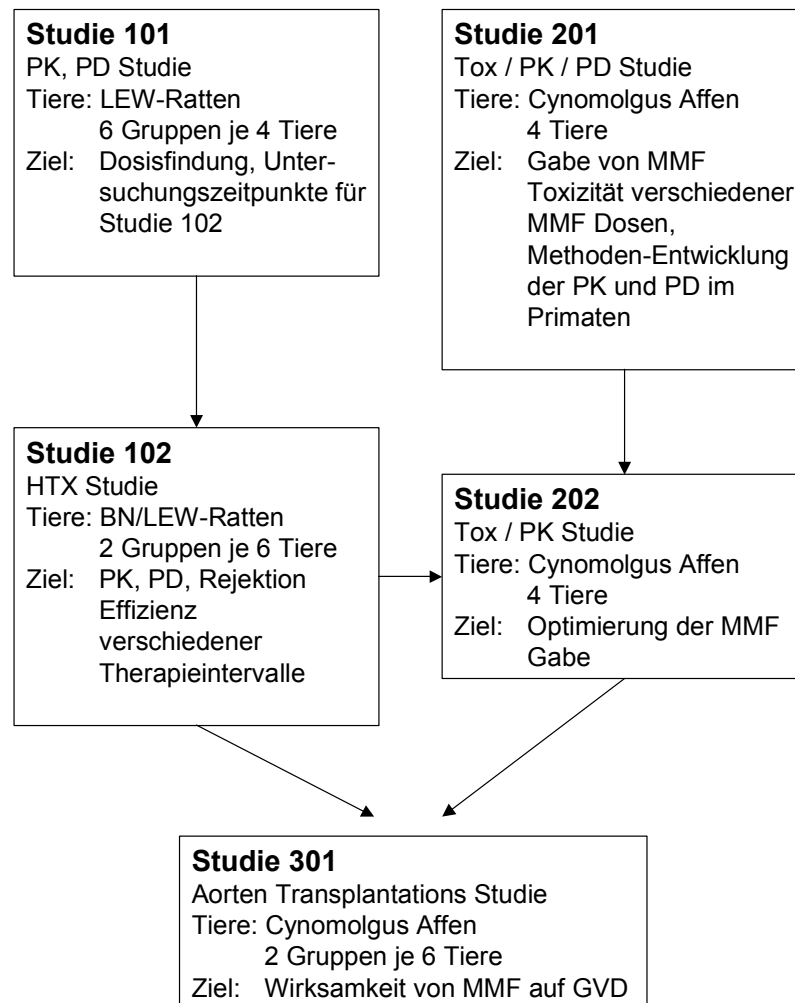


Abbildung 7: Studien Design. Die Studien 101 und 102 wurden im Rattenmodell und die Studien 201 und 202 im Primatenmodell durchgeführt. Sie dienten der Vorbereitung zur Aortentransplantations-Studie 301, um die MMF - Dosis, - Formulierung und - Administration zu optimieren. Ferner wurden die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Methoden im Primatenmodell etabliert. (PK: Pharmakokinetik; PD: Pharmakodynamik; LEW: Lewis Ratten; BN: Brown-Norway Ratten, HTX: Herztransplantation; Tox: Toxikologie)

Insgesamt wurden vier Studien zur Vorbereitung der Hauptstudie 301 durchgeführt (Abbildung 7). Die Studien 101 und 102 erfolgten im Rattenmodell und die Studien 201

und 202 im Primatenmodell. In diesen Studien wurden verschiedene MMF - Dosierungen, - Dosierungsintervalle und - Applikationswege getestet. Ferner wurden Methoden für pharmakokinetische und pharmakodynamische Meßparameter vom Ratten- ins Primatenmodell transferiert, getestet und validiert (Klupp et al., 2000). Medikamententoxizität und deren Behandlungsmöglichkeiten wurden geprüft.

1. Studie 101

Bei der Studie 101 (Abbildung 8) handelte sich um eine PK/PD Studie in Lewis Ratten. In 6 Gruppen von je 4 Ratten wurden orale MMF Dosierungsintervalle von 24 (QD: „Quaque Die“; einmal täglich) und 12 Stunden (BID: „Bis In Die“; zweimal täglich) in vergleichbaren Tagesdosen getestet.

Zeit (h)	0	0.5	6	12	12.5	18	24	30	36
Gruppe A	5			V					
Gruppe B	5			5					
Gruppe C	10			V					
Gruppe D	10			10					
Gruppe E	20			V					
Gruppe F	V			V					
PK / PD Blutentnahmen	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Abbildung 8: Design Studie 101.

Verglichen wurde die einmal tägliche (QD) mit der zwei mal täglichen (BID) Gabe von MMF in einer PK/PD Studie an nicht transplantierten Lewis Ratten über 36 Stunden. In den QD Gruppen A, C und E erfolgte eine einmalige MMF Gabe morgens um 8:00 Uhr, in den Gruppen B und D die Gabe um 8:00 und 20:00 Uhr.

Dosierungsangaben in mg/kg. V:

Vehikel – Methylcellulose-Lösung

Tiere in Gruppe A erhielten 5 mg/kg MMF einmalig (QD), in Gruppe B 5 mg/kg MMF zweimalig (BID), in Gruppe C 10 mg/kg QD, in Gruppe D 10 mg/kg BID und in Gruppe E 20 mg/kg QD. Tiere in Gruppe F dienten als Kontrolltiere und wurden nur mit Vehikel – Lösung gavagiert. Die Studiendauer betrug 36 Stunden mit einer MMF Gabe zu den Zeitpunkten 0h in den Gruppen A, C und E und mit MMF Gaben zu den Zeitpunkten 0h und 12h in den Gruppen B und D. Retroorbitale Blutentnahmen unter Ätheranästhesie erfolgten vor, 30 Minuten, 6 Stunden, 12 Stunden, 12,5 Stunden, 18 Stunden, 24 Stunden, 30 Stunden und 36 Stunden nach Medikamenten Erstgabe. Gemessen wurden die MPA und MPAG Plasmaspiegel mittels HPLC (Gummert et al., 1999b). Nach mitogener ConA Stimulation wurden mittels Durchfluss-Zytometrie die Lymphozytenproliferation (intrazelluläre PCNA Expression) und die T Zell Aktivierung anhand der Oberflächen-Antigenpräsentationen von IL-2 Rezeptor (CD25), Transferrin Rezeptor (CD71), der Adhäsionsmoleküle LFA-1 (CD11a) und ICAM-1 (CD54) bestimmt. Von zuvor durchgeführten Untersuchungen (Gummert et al., 1999a) war bekannt, dass in diesem Tiermodell die pharmakodynamischen Parameter den Rejektionsgrad nach heterotoper Herztransplantation widerspiegeln. Somit sollten die PK/PD Ergebnisse der Studie 101 dazu dienen, die MMF - Dosen und die Zeitpunkte der Blutentnahmen für die nachfolgende Transplantationsstudie 102 festzulegen.

2. Studie 102

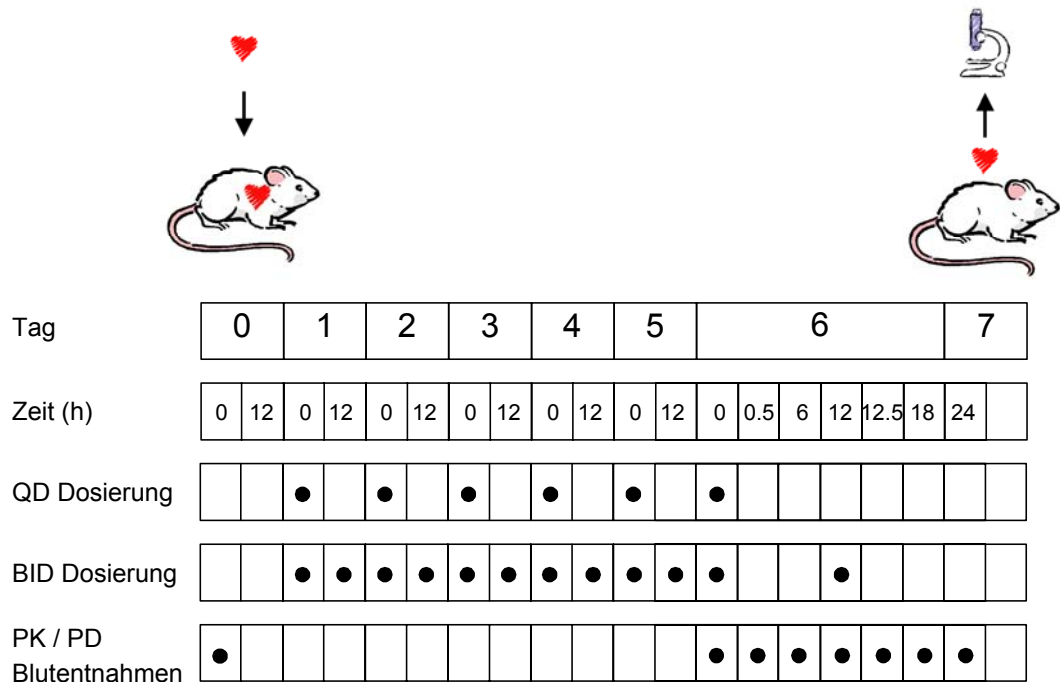


Abbildung 9: Design Studie 102. Heterotope Herztransplantation von BN zu Lewis Ratten. Die Nachbeobachtungsdauer betrug 7 Tage. Vor der Transplantation und am Tag 6 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut für die PK und PD Untersuchungen entnommen und mit der Histologie an Tag 7 verglichen. Die Studie umfasste zwei Gruppen mit je 6 Tiere, die mit einer Gesamt-Tagesdosis von 10 mg/kg MMF behandelt wurden. (5 mg/kg BID vs. 10 mg/kg QD). Die Studie prüfte die Frage, ob die tierexperimentelle übliche QD Gabe von MMF eine niedrigere Effektivität zur klinisch üblichen BID Gabe aufzeigt.

Mit den aus der vorherigen Studie gewonnenen Daten wurde diese Transplantationsstudie geplant. Insgesamt 12 Lewis Ratten waren Empfänger von heterotop ins Abdomen verpflanzten Herzen von Brown-Norway Spendern. Zwei Gruppen mit je 6 Tieren erhielten insgesamt eine Tagesdosis von 10 mg/kg MMF. Bei den Tieren in Gruppe A erfolgte die Gabe einmal täglich (10 mg/kg MMF QD), bei den Tieren in Gruppe B wurde die Gesamtdosis in zwei Einzeldosen (5 mg/kg MMF BID) aufgeteilt.

Die Wirkung des Dosierungsintervalls auf den Rejektionsgrad an Tag 7 wurde evaluiert. Die Blutentnahmen fanden zu den in Studie 101 getesteten Zeitpunkten am Tag 6 nach Transplantation statt. Die beschriebenen pharmakokinetischen und

pharmakodynamischen Parameter wurden mit der Histologie verglichen. Ziel dieser Studie war es zu prüfen, ob die im Tierversuch übliche einmal tägliche Gabe von MMF negativ mit dem Abstoßungsverhalten des Transplantates korrelierte. Weiterhin wurde die Möglichkeit evaluiert, PK und PD Parameter zum Monitoring zu verwenden.

3. Studie 201

Studie 201 bestand aus einem *in vitro* und einem *in vivo* Teil. *In vitro* wurden die im Rattenmodell entwickelten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Methoden für den Primaten angepaßt und weiterentwickelt. Die bestehende HPLC – Methode zur Bestimmung von MPA und MPAG Plasmaspiegeln (Gummert et al., 1999b) wurde für *Cynomolgus fascicularis* Plasma optimiert und validiert. Die vorbeschriebenen pharmakodynamischen Methoden, die für die T Zell Aktivierung im Rattenmodell entwickelt worden waren (Gummert et al., 1999a; Barten et al., 2001), wurden auf das Primatenmodell übertragen. Hierzu wurden verschiedene Mitogene, in verschiedenen Konzentrationen und mit unterschiedlichen Stimulationszeiten evaluiert, um nicht nur T Zellen, sondern auch B Zellen und Monozyten untersuchen zu können. Humane Antikörper wurden auf Kreuzreaktivität mit *Cynomolgus* Antigenen getestet und das Spektrum der untersuchten Antigene wurde erheblich erweitert. Ebenso wurde die Methode des intrazellulären Zytokin-Nachweis in T Zellen und Monozyten im Makaken entwickelt. Einzelheiten dieser Methodenentwicklung werden hier nicht detailliert aufgeführt, da eine Zusammenfassung der Methodik publiziert ist (Klupp et al., 2000; Klupp et al., submitted-a).

Diese zunächst *in vitro* entwickelten Methoden wurden dann *in vivo* an 4 *Cynomolgus* Affen validiert. In diesem Versuch wurden die Tiere für 21 Tage einmal täglich mit verschiedenen MMF Dosen, beginnend mit 100 mg/kg mittels Gavage behandelt. Neben der Bestimmung der verschiedenen PK und PD Parametern galt die besondere Aufmerksamkeit der sich entwickelten Medikamententoxizität.

4. Studie 202

In Studie 201 bestätigte sich die Beobachtung aus den Rattenversuchen, dass mit einer einmal täglichen MMF - Gabe keine suffiziente immunsuppressive Wirksamkeit über einen 24 Stunden Zeitraum zu erzielen war, und dass hohe Dosen zu einer erheblichen Toxizität führten. Weiterhin zeigte sich in der vorangegangenen Studie, dass die notwendigen Mengen von zu verabreichendem MMF sich in dem Vehikel nicht lösen bzw. dass das zur Lösung notwendige Volumen für die Gavage zu groß war. Ferner führte die inhomogene Suspension zu Dosierungsproblemen. In Studie 202 wurde somit bei 2 Affen in einer vierzehntägigen Studie die BID Gabe von subkutanem CellCept-IV[®] getestet und bei 4 Affen die orale Resorption von CellCept-IV[®] geprüft. Hierbei wurde Pharmakokinetik und Verträglichkeit getestet.

5. Studie 301

In der Aorten-Transplantationsstudie 301 wurde bei 6 Cynomolgus Affen eine orthotope, infrarenale Aortensegment-Transplantation durchgeführt. Nachdem sich ohne jegliche Immunsuppression eine Intimahyperplasie im Sinne einer Transplantat-Vaskulopathie entwickelte, wurde ab Tag 45 mit der MMF Therapie begonnen. Diese Tiere wurden mit einer Kontrollgruppe von weiteren 6 Tieren verglichen, die bis zum Ende des Versuchs am Tag 105 keine Immunsuppression erhielten. Entsprechend den Ergebnissen der Studien 101 – 202 wurden die Tiere in der Behandlungsgruppe individuell, zweimal täglich mit CellCept-IV[®] behandelt. In Studie 301 wurden die in den Vorstudien entwickelten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Methoden verwendet, um die MMF Therapie zu optimieren. Die Dosis wurde entsprechend der auftretenden Medikamententoxizität, den MPA Plasmaspiegeln und der Lymphozyten-Proliferationsrate im peripheren Blut täglich angepaßt. Bei allen Tieren wurde an den postoperativen Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 ein intravaskulärer Ultraschall durchgeführt. Nach Abschluß des Versuches wurden die Tiere getötet und die Aortentransplantate histologisch aufgearbeitet und vermessen. Primäres Zielkriterium der Studie war die Intimahyperplasie im mittleren Segment des Transplantates. Die anastomosennahen Segmente wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen um sicher zu stellen, dass die

beurteilte Intimahyperplasie nicht durch chirurgische Artefakte, sondern nur durch die allogene Immunantwort hervorgerufen wurde. Des weiteren wurden diese morphometrischen Variablen mit der mittleren verabreichten MMF Dosis und verschiedener pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern korreliert, um die Frage beantworten zu können, ob und in welchem Ausmaß MMF in der Lage ist die Entwicklung der Transplantat-Vaskulopathie zu beeinflussen.

B. Tiere und Tierhaltung

1. Ratten

Männliche, virusantikörperfreie Lewis Ratten (RT1¹/CrIBR) (LEW) mit einem Gewicht von 300 – 350 g, 11 bis 15 Wochen alt und Brown-Norway Ratten (RT1ⁿ) (BN) mit einem Gewicht von 250 – 350 g, 11 bis 16 Wochen alt, wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) bezogen und in Mikroisolationssäfen untergebracht. Standarddiät für Ratten und Wasser wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden über eine Woche in den Tierräumen bei einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus akklimatisiert, bevor mit den Versuchen begonnen wurde. Die Tiere wurden entsprechend den Richtlinien „Principles of Laboratory Animal Care“ der National Society for Medical Research und dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des National Health Institute (NIH Publikation No. 80 – 123, Revision 1985) versorgt. Die Studien wurden durch die Tierversuchskommission (Stanford University, 1999) der Stanford Universität (Stanford CA, USA) genehmigt.

2. *Cynomolgus* Affen

Zwanzig gesunde, männliche *Cynomolgus* Affen (*Macaca fascicularis*) (5,9 – 8,3 kg) wurden von Charles River BRF Inc. (Houston, TX, USA) bezogen. In einem Screening wurden Infektionen (Herpes B-Virusinfektion, Hepatitis, Tuberkulose, Simian immunodeficiency Virusinfektion, Simian Retrovirusinfektion und Simian T-lymphotrophische Virusinfektionen) ausgeschlossen. Nach Überstellung der Tiere nach Stanford wurden diese zunächst in 6 wöchiger Quarantäne gehalten, bevor sie für die Tierexperimente freigegeben wurden. Die Tiere standen unter kontinuierlicher

veterinärmedizinischer Aufsicht. Sämtliche Versuche wurden durch die Tierversuchskommission (Stanford University, 1999) der Stanford Universität (Stanford, CA, USA) genehmigt und die Versuchsdurchführung von Tierärzten überwacht. Bei den Tieren wurden eine Blutgruppenbestimmung durch das New York University Medical Center Laboratory for Experimental Medicine and Surgery in Primates durchgeführt. In der Transplantationsstudie diente jedes Tier gleichzeitig als Spender und Empfänger des Aortentransplantates. Die Tiere wurden ABO-Blutgruppen-identisch gepaart und die Histoinkompatibilität wurde durch einen Stimulationsindex von mindestens 2,0 (SI: 2,7 – 38,3) im MLR sichergestellt.

Vor jeglicher Prozedur wurden die Tiere zunächst für mindestens eine Woche in dem Raum akklimatisiert, in dem sie für die Dauer des Versuches gehalten wurden. Raumluft und –temperatur wurden kontrolliert und ein Tag/Nachtzyklus von 12 Stunden eingehalten. Die Tiere erhielten Standard Primatendiät und Wasser *ad libitum*. Zusätzlich wurde die Nahrung durch frische Früchte und Gatorade[®] (Stokely-Van Camp, Inc, Indianapolis, IN, USA) angereichert. Bei Gewichtsverlusten von mehr als 5% wurde eine Sonderdiät bestehend aus Honig, Butter, Nudeln und Boost Plus[®]-Hyperalimentationnahrung (Mead Johnson Nutritionals, New York, NY, USA) über eine unter Ketamin Sedierung (5 mg/kg i.m.) gelegte Magensonde verabreicht (Gavage). Die Tiere wurden entsprechend den Richtlinien der US Public Health Policy of the Humane Care and Use of Animals (PHS Manual, Ch. 143) und dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des National Health Institute (NIH Publikation No. 8523, Revision 1985) versorgt (Stanford University, 1999).

C. Operative Modelle

1. *Heterotope Herztransplantation im Rattenmodell*

Die intraabdominelle heterotope Herztransplantation wurde modifiziert nach Ono und Lindsay (Ono und Lindsey, 1969) durchgeführt (Abbildung 10). Die Spender BN Ratten wurden mit 50 mg/kg Phenobarbital durch intraperitoneale Injektion anästhesiert.

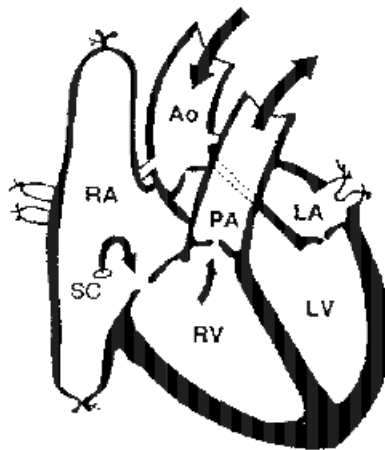


Abbildung 10: Heterotope Herztransplantation nach Ono (Ono und Lindsey, 1969) im Rattenmodell. Die Aorta (Ao) des Spenderherzens wird mit der Aorta abdominalis des Empfängers anastomosiert und über diese Verbindung mit arteriellem Blut versorgt. Das aus dem Sinus coronarius (SC) kommende Blut fließt über den rechten Vorhof (RA) und den rechten Ventrikel (RV), die Pulmonalarterie (PA) in die Vena cava inferior des Empfängers. (Modifiziert nach Chapman et al., 1994).

Nach Eröffnung der Bauch und Brusthöhle wurden 1000 IE/kg Heparin (Fujisawa Inc., Delaware, IL, USA) über die V. cava inferior injiziert und die A. pulmonalis und Aorta ca. 3 mm distal des Ursprungs durchtrennt. Nach topischer Kühlung mit 4°C kalter isotoner Kochsalz Lösung folgte die Ligatur der V. cava superior und inferior, sowie der Pulmonalvenen mit 5-0 Vicryl und die Excision des Herzens. Vorhöfe und Ventrikel wurden mit der kalten Kochsalz Lösung gespült und das Herz bis zur Implantation in 4°C kalter isotoner Kochsalz Lösung gelagert.

Nach entsprechender Anästhesie der Empfänger Ratte (LEW) wurden die Aorta abdominalis und V. cava inferior infrarenal auf einer Länge von 2 cm dargestellt und ausgeklemmt. Das Spenderherz wurde mit fortlaufender Nahttechnik mit 8-0 Ethilon mit einer BV 130-4 Nadel (Ethicon Inc., Somerville, NJ, USA) anastomosiert. Die Ischämiezeiten lagen zwischen 20 und 26 Minuten, die Gesamt-Operationszeiten zwischen 32 und 47 Minuten. Die technische Erfolgsrate lag bei 100%.

2. *Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell*

Alle operativen Eingriffe wurden bei den Affen in einer tiefen Allgemeinnarkose durchgeführt. Diese wurde mit 10 mg/kg Ketamin-Hydrochlorid (Ketanest®) s.c. eingeleitet.

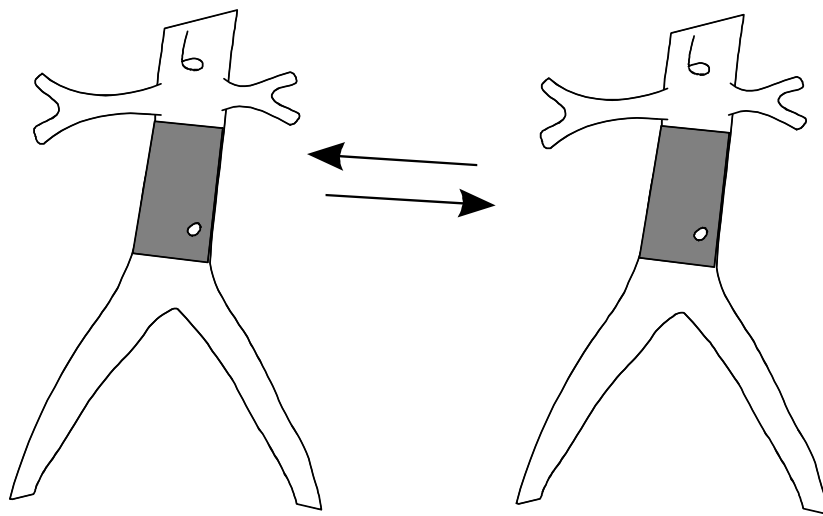


Abbildung 11: Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell. Ein 3 cm langes infrarenales Segment wird zwischen zwei blutgruppen-identischen, aber histo-inkompatiblen Tieren transplantiert. Hierbei dient jedes Tier gleichzeitig als Spender und Empfänger

Zusätzlich erhielten die Tiere vor endotrachealer Intubation noch 0,04 mg/kg Atropin-Sulfat i.m. und 0,01 mg/kg Buprenorphin-Hydrochlorid (Buprenex®) i.m.. Die Narkose wurde mit Propofol (2,5 mg/ml; 0,1 mg/kg/min) und Midazolam Infusion (1 mg/ml; 0,35 µg/kg/min) fortgeführt. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde 20 ml/kg/h Ringer-Lactat Lösung infundiert. Bis zur Extubation erfolgte ein engmaschiges Monitoring bei

dem kontinuierlich EKG, Körpertemperatur, Sauerstoff-Sättigung, Respirationsrate und endexpiratorische CO₂ - Messungen durchgeführt wurden. Der Blutdruck wurde in 3 minütlichen Intervallen mittels Manschette am Oberarm gemessen und alle Daten sind in 15 minütlichen Intervallen dokumentiert worden. Perioperativ bis zum 3. postoperativen Tag erhielten die Tiere eine antibiotische Prophylaxe, bestehend aus Cefazolin (25 mg/kg i.m.) und Gentamicin (5 mg/kg i.m.). Postoperativ wurden die Tiere in spezielle Käfige verbracht, in denen die Käfigtemperatur und der Sauerstoffgehalt der Luft individuell geregelt werden konnte. Zur postoperativen Schmerzkontrolle wurde 0.03 mg/kg Buprenorphin-Hydrochlorid (Buprenex[®]) i.m. alle 6 bis 8 Stunden verabreicht.

Alle Tiere dienten gleichzeitig als Spender und Empfänger eines 3 cm langen, infrarenalen Aortensegmentes. Die Eingriffe wurden parallel durchgeführt, um Ischämie- und Operationszeiten konstant zu halten. In tiefer Narkose wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und die infrarenale Aorta bis über die Iliacal-Bifurkation hinaus dargestellt. Drei Zentimeter wurden von der Bifurkation aus vermessen und falls notwendig die A. mesenterica inferior abgesetzt. Nach Heparin-gabe (70 IE/kg) wurde das fadenmarkierte Aortensegment nach Unterbindung der Lumbalarterien reseziert, mit 4°C kalter Kochsalz Lösung gespült und mit dem Segment des anderen Empfängertieres ausgetauscht. Die zur Vermeidung von Strikturen angeschrägte Anastomose erfolgte in fortlaufender Technik End-zu-End mit Prolene 7-0 (Abbildung 12). Nach Kontrolle auf Bluttrockenheit wurde das Retroperitoneum und das Abdomen wieder schichtweise verschlossen.

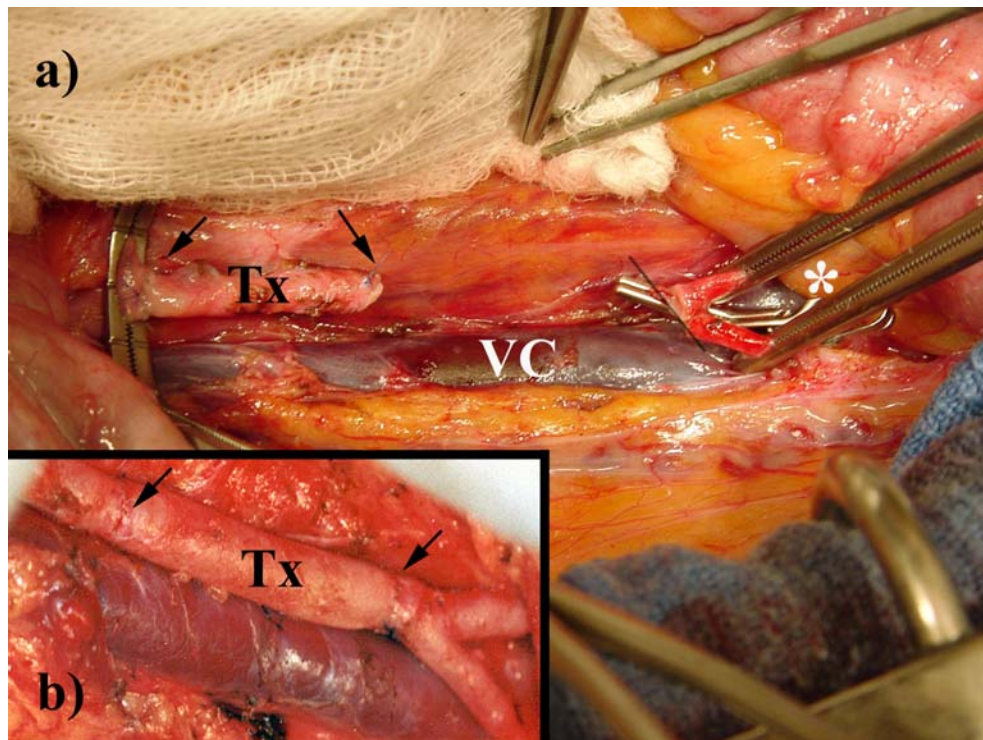


Abbildung 12: Operationssitus bei Aortentransplantation. Anastomosen sind mit Pfeilen markiert: a) Durch die Eigenelastizität der Aorta kommt es nach Explantation des Transplantates (Tx) zu einer erheblichen Streckendifferenz. Der Stern (*) markiert die Gefäßklemmen auf den beiden Iliacal-Arterien und die mit einer Bulldog-Klemme versorgte Schwanzarterie. VC: Vena cava. b) Situs nach Reperfusion

3. *Intravaskulärer Ultraschall (IVUS)*

a) *Operative Durchführung*

Die intravaskuläre Ultraschalluntersuchung (IVUS) wurde an den Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 nach Transplantation durchgeführt. In tiefer Allgemeinnarkose wurde die rechte oder linke Leiste freigelegt und die A. femoralis communis und superficialis dargestellt. Nach Heparinisierung (70 IE/kg i.v.) und querer Arteriotomie wurde eine 5F Schleuse in das Gefäß eingeführt (Abbildung 13). Nach intraarterieller Injektion von 20 µg Nitroglycerin wurde ein 5F Swanz-Ganz-Katheter (Baxter, Deerfield, IL, USA) bis in die thorakale Aorta vorgeschoben und eine stufenweise intravasale Blutdruckmessung durchgeführt, um die Druckgradienten an den Anastomosen aufzuzeichnen.

Die sequentielle Ultraschalluntersuchung wurde mit dem Cardiovascular Imaging System (Boston Scientific, Sunnyvale, CA, USA) und einem 40 MHz 2,6F Ultraschallkatheter (SciMed / Boston Scientific, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt. Der Schallkopf wurde oberhalb der Nierenarterienabgänge platziert und unter kontinuierlichem, maschinellem Rückzug (0,5 mm/sec) durch das Transplantat geführt. Die IVUS-Bilder wurden zur späteren Analyse auf ein S-VHS Band aufgezeichnet. Nach Abschluß der Untersuchungen erfolgte der Verschluß der Arteriotomie mit 7-0 Prolene Einzelknopfnähten.

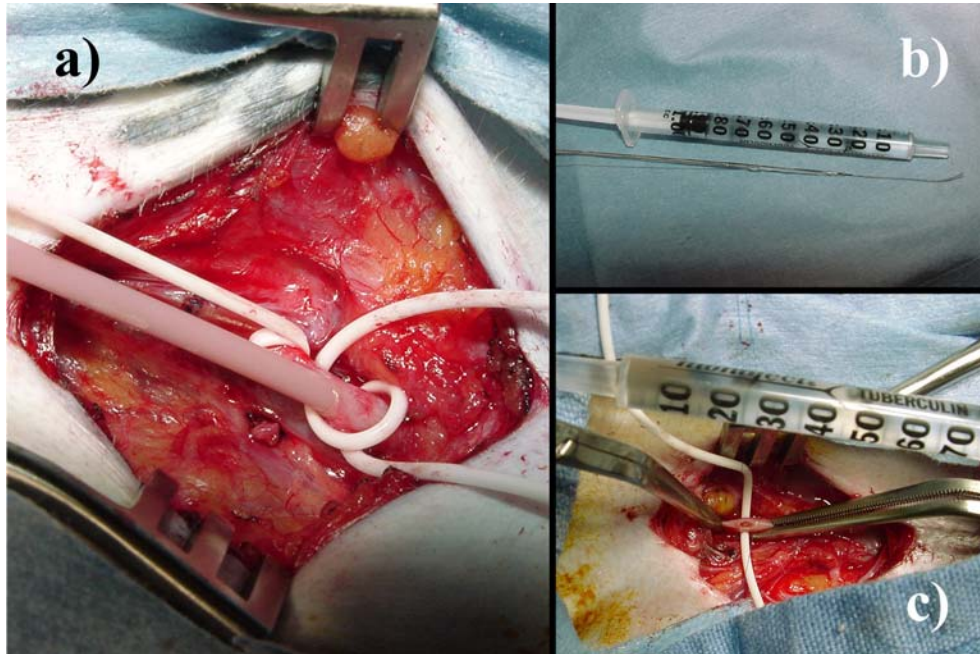


Abbildung 13: Intravaskulärer Ultraschall. Die Femoralarterie wird freigelegt (a) und eine 5F Schleuse eingeführt. Über diese wird ein 2,6F Ultraschallkatheter (b) in die Aorta vorgeschoben und der Scan wird unter kontinuierlichem Rückzug (0,5mm/sec) auf ein S-VHS Videoband aufgezeichnet. c) Verschluss der Arteriotomie mit Prolene 7-0 Einzelknopfnähten

b) Morphometrische Analysen und Datenverarbeitung

Die aufgezeichneten Ultraschallbilder wurden mit der Echoplaque[®] Software (Indec Systems Inc., Mountain View, CA, USA) mit 15 Bilder/sec digitalisiert und 3-D rekonstruiert. Die Konturen der Intima- und Lumenbegrenzungen wurden in 1 mm Abständen gezeichnet und vom System in den Zwischenräumen interpoliert. Flächen und Durchmesser wurden manuell ausgemessen und die Volumenberechnung wurde von der Software gemäß folgender Formel

$$V = n * \sum_{i=1 \dots n} (A_i * H)$$

berechnet, wobei A_i die Fläche des Segmentes i , H die Dicke des Segmentes i (0,33 mm bei einer Rückzugsgeschwindigkeit von 0,5 mm/sec) und n die Zahl der gemessenen IVUS-Segmente darstellt. Volumetrisch wurden das Gefäßvolumen (VV), das Lumenvolumen (LV) und das Intimavolumen (IV) bestimmt. Gemessene Flächen waren Gefäßfläche (VA), Lumenfläche (LA) und Intimafläche (IA) in dem mittleren 1cm langen Segment des Transplantates. Die Randsegmente wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen um mögliche Störeinflüsse durch die Anastomosen auszuschließen. Durch Einlesen der planaren, longitudinalen Rekonstruktion wurden minimale und maximale Flächenwerte für Lumen (LA_{\min} , LA_{\max}) und Intima bestimmt (IA_{\min} , IA_{\max}).

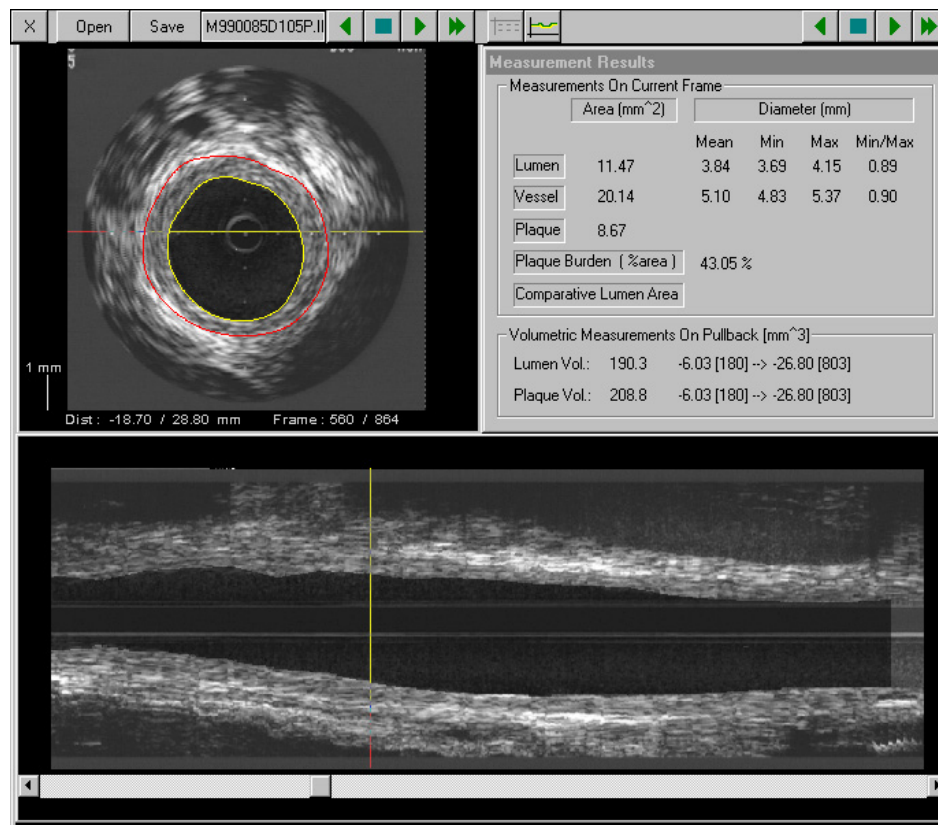


Abbildung 14: Computerbild der mit Echoplaque® 3-D digitalisierten IVUS-Bilder. Zwischen den manuell bestimmten Flächen für Intima, Lumen und Gefäß interpoliert das System die Zwischenwerte um so eine planare longitudinale Gefäßdarstellung zu berechnen. Rot, die nachgezeichnete Membrana interna elastica, gelb die Grenze der Intima zum Gefäßlumen

D. Histologische Analysen

1. Heterotope Herztransplantation im Rattenmodell

Ein Pathologe (Frau Prof. Margret E. Billingham) führte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit, an den fixierten und mit Hämatoxylin & Eosin gefärbten Präparaten die histologische Analysen durch. Anhand von drei Querschnitten durch das Transplantat wurde die akute Rejektion in sechs Schweregrade eingeteilt:

Grade 0 – keine histologischen Zeichen einer Rejektion, Grade 1 – geringe Lymphozyteninfiltration ohne Nekrosen oder Einblutungen, Grade 2 – mäßiggradige mononukleäre oder lymphozytäre Infiltrate mit minimalen Nekrosen, ohne Einblutungen,

Grade 2.5 – mäßiggradige bis schwere entzündliche Infiltration, Grade 3 – massive Infiltrate mit Nekrosen und perivaskulärer Einblutung, Grade 4 – massive Einblutungen und Nekrosen und Verlust der Zellmorphologie.

2. Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell

a) Euthanasie, Transplantat Gewinnung und Präservierung

Nach der letzten IVUS-Untersuchung an Tag 105 wurde in tiefer Narkose eine Thorakotomie durchgeführt und die Aorta auf ihrer gesamten Länge dargestellt. Abgänge der Aorta wurden unterbunden und die thorakale Aorta wurde kanüliert. Nach der Tötung der Tiere mit einer Überdosis von Pentobarbital, wurde die Aorta mit dem Transplantat zunächst mit isotoner Kochsalz Lösung gespült und anschließend *in situ* mit 10% Formalin Lösung mit einem intravaskulären Druck von 100 mm Hg für 10 Minuten vorfixiert. Dann erfolgte die Exzision der Aorta und des Transplantates. Anschließend wurde das Präparat *ex vivo* für 18 Stunden mit einem intravaskulären Druck von 100 mm Hg weiter mit 10% Formalin Lösung vollständig fixiert um ein elastisches Schrumpfen des Gefäßes zu verhindern.

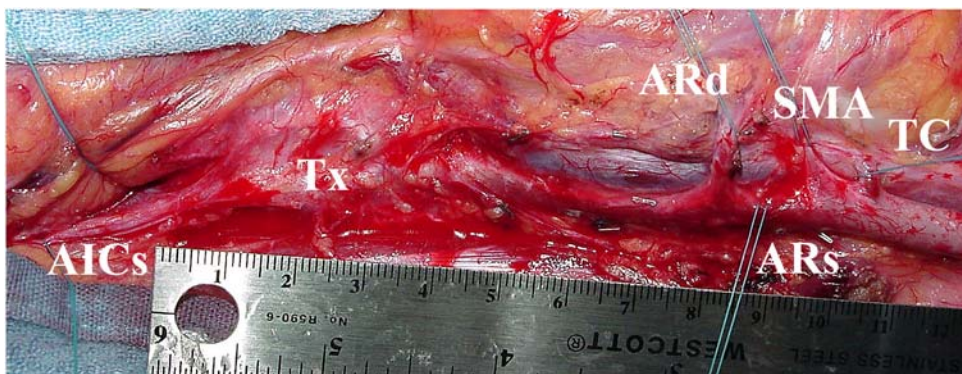


Abbildung 15: Nekropsie und Darstellung des Aortentransplantates (Tx). Truncus coeliacus (TC), A. mesenterica superior (SMA), rechte (ARd) und linke Nierenarterie (ARs), sowie A. iliaca communis (AICs) links und rechts werden vor der *in situ* Perfusion unterbunden.

b) Histologische Färbungen und Immunhistochemie

Das Transplantat wurde alle 1 mm in 4 μm dicke, quere Sektionen geschnitten, Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin & Eosin, sowie mit einer Elastin – van Gieson Färbung dargestellt. Entparaffinierte Schnitte wurden mit Antikörper (Verdünnung 1:4000, Sigma Corp., St. Louis, MO, USA) gegen α -Actin / glatte Muskelzellen gefärbt. Die qualitative histologische Beurteilung erfolgte durch einen Pathologen (Dr. Gerald Berry), der keine Kenntnis von der Gruppenzugehörigkeit der Präparate hatte. Neben der Ausprägung der Intimahyperplasie wurde die Zerstörung der Membrana elastica interna, die Infiltration der Media und des periadventitiellen Bindegewebes begutachtet.



Abbildung 16: Ex vivo Perfusion mit 10% Formalin Lösung für 18 Stunden mit einem intravasalen Druck von 100 mm Hg um eine Schrumpfung des Transplantates zu vermindern und somit eine möglichst exakte morphometrische Vermessung zu ermöglichen

c) Morphometrische Analysen

Video Bilder von Elastin – van Gieson gefärbten Präparaten wurden mit einer Dage MTI-81 hochauflösenden Farbbildkamera auf einem Leica DMAB Mikroskop aufgenommen. Die morphometrische Analyse erfolgte mit dem C-imaging 1280 Morphometrie System (Compix Inc., Cranberry Township, PA, USA). Im 1 cm langen, mittleren Drittel des Transplantates wurden die Sektionen manuell nachgezeichnet und die Mittelwerte für

Lumenfläche (LA), Intimafläche (IA) und Gefäßfläche (VA) mit der Systemsoftware berechnet. Korrespondierend zur IVUS-Auswertung wurden auch die minimalen und maximalen Querschnitte bestimmt.

E. Behandlung mit Mycophenolat Mofetil

1. Ratten

Reines Mycophenolat Mofetil Pulver (Gabe von Roche Bioscience, Palo Alto, CA, USA) wurde zur Therapie in den Studien 101 und 102 verwandt. Die Vehikel-Lösung für MMF wurde aus 0,2% Natriumcarboxymethylcellulose-Lösung (Viskosität von 1300 – 2200 Zentipoises bei 25°C, 1% Lsg.) (CMC ; City Chemical Corp., New York, NY, USA), 0,9% Benzyl-Alkohol (V/V), 0,4% Polysorbat 80 (W/V) und 0,9% Natrium Chlorid (W/V) in de-ionisiertem Wasser hergestellt, hitzesterilisiert und bei 4°C gelagert. Bei einem pH von 3,5 wurde hierbei eine maximale Löslichkeit von 4,3 mg MMF / ml Vehikel erreicht. Unmittelbar vor der Anwendung wurden 1 bis 4 mg/ml MMF Lösungen frisch zubereitet, und die nicht narkotisierten Tiere erhielten bei jeder Therapie 2 ml/kg Vehikel-Lösung mittels Gavage. Die Behandlung der Tiere mit MMF oder reiner Vehikel Lösung fand um 8:00 und 20:00 Uhr statt.

2. *Cynomolgus Affen*

In der Studie 201 wurde aus dem oben beschriebenen Vehikel und reinem MMF Pulver eine 64 mg/ml Suspension hergestellt. Unter Ketanest[®] Sedierung (5 mg/kg) wurde den Tieren die MMF - Suspension über eine Magensonde verabreicht (Gavage). In den Studien 202 und 301 wurde CellCept-IV[®] (MMF Hydrochlorid Lösung; Gabe von Roche Laboratories Inc., Nutley, NJ, USA) mit einer initialen Dosis von 100 mg/kg/Tag, aufgeteilt in zwei Einzeldosen subkutan injiziert oder oral mittels Gavage appliziert. In der Transplantationsstudie wurde mit der MMF Gabe an Tag 45 begonnen und die Dosierung individuell angepaßt um eine maximal tolerierte Dosis (MTD) zu erreichen: Ein Gesamtgewichtsverlust der Versuchstiere von 10% oder ein Verlust von 3% des Körpergewichtes innerhalb von 3 Tagen, sowie Erbrechen und Diarrhoe führten zu einer 20%igen Dosisreduktion. MPA-Plasmaspiegel von kleiner als 2,0 mg/l und Lymphozyten-Proliferationsraten von mehr als 5% führten zu einer MMF-Dosiserhöhung von 10 mg/kg/Tag.

F. Analytische Methoden

Sämtliche Blutentnahmen bei Ratten wurden an Äther-anästhesierten Tieren durchgeführt. In tiefer Narkose wurde mit Heparin-beschichteten Mikropipetten der retroorbitale Venenplexus punktiert und maximal 500 µl Blut gewonnen. Bei den Affen erfolgte die venöse Punktion, vornehmlich aus der Vena femoralis unter Ketanest[®] Sedierung (5 mg/kg). Die notwendige Blutmenge für die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Messungen lag unter 2 ml pro Abnahme. Das heparinisierte Blut wurde innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet.

1. *Pharmakokinetik (PK) der Mycophenolsäure*

Die MPA und MPAG Plasmaspiegel Bestimmungen wurden mittels einer Gradienten HPLC Analyse bestimmt. Die Methode ist eigens für minimale Plasmamengen für das Rattenmodell entwickelt und publiziert worden (Gummert et al., 1999b). Zu 50 µl Plasma wurden 100 µl Phenolphthaleinglukuronsäure (PGA; Sigma Chemicals, St. Louis, MO,

USA) gelöst in Acetonitril (Baxter, Deventer, Niederlande) in einer Konzentration von 25 µg/ml als interner Standard hinzu gegeben. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und 0,1%iger Schwefelsäure (pH 1,5). Eine 200 x 4,6 mm Sphèreclone 5 µm ODS Chromatographie Säule (Phenomenex, Torrance, CA, USA) wurde auf einem HPLC System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) verwandt. Die MPA und MPAG Konzentrationen wurden unter Verwendung einer Kalibrationskurve mit der Class-VP Software Vers. 4.2 (Shimadzu, Kyoto, Japan) berechnet.

Diese Methode konnte problemlos auf Affenplasma übertragen werden. Es wurde eine Linearität der Ergebnisse von $r^2=0,99$, eine Intra-Tag Präzision von 2,5% und eine Inter-Tag Präzision von 9,25% erreicht.

Nach MMF Gabe wurde in den verschiedenen Versuchen zu verschiedenen Zeitpunkten Blut gewonnen und aus den MPA Spiegeln die AUC mittels der linearen Trapez-Regel bestimmt:

$$AUC_{0-n} = (C_0 + C_1 / 2) * t_1 - t_0) + (C_1 + C_2 / 2) * t_2 - t_1) + ... (C_{n-1} + C_n / 2) * t_n - t_{n-1})$$

Hierbei benennt C_n die MPA Konzentration zum Zeitpunkt t_n .

2. *Pharmakodynamik (PD) der Mycophenolsäure*

Die entwickelten Methoden sind publiziert (Gummert et al., 1999a; Klupp et al., 2000; Barten et al., 2001; Klupp et al., 2001a; Klupp et al., 2001b; Klupp et al., 2001c; Klupp et al., submitted-a; Klupp et al., submitted-b) und werden hier zusammengefaßt:

a) *Reagenzien*

Das Kulturmedium RPMI1640 wurde mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin ergänzt (alles: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Die Mitogene Concanavalin A (ConA; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), Pokeweed Mitogen (PWM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) und Lipopolysaccharid (LPS E.coli, Serotyp 055:B5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,

USA) wurden im Kulturmedium verdünnt, steril gefiltert und bei -70°C gelagert. Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) und Brefeldin A (beides von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) wurden in DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) und Ionomycin (IONO; ICN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA, USA) in Ethanol gelöst und bei -20°C gelagert.

Alle FITC-, PE-, PECy5-, PCP- und Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper wurden von Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen. In den Rattenexperimenten wurden Antikörper gegen OX-52 (anti-T Zell-Ak), CD71 (Transferrin-Rezeptor), CD25 (IL-2 Rezeptor), CD11a (LFA-1) und CD54 (ICAM-1) verwendet. Die gegen die menschliche Antigene (CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD20, CD25, CD69, CD 86 (B7-2), CD71, CD95 (FAS), CD154 (CD40L), $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2, IL-4) gerichteten Antikörper wurden im Primatenmodell auf Kreuzreaktivität getestet. Streptavidin-PECy5 und anti-PCNA-Ak wurden von Dako Co. (Carpinteria, CA, USA) und RNase, Propidium-Jodid (PI), Saponin und Natriumazid wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) bezogen. Das Lysat für die Erythrozyten wurde täglich frisch aus 8,29g NH_4Cl , 37,2 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und 1 g KHCO_3 (alles von J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA) in 1 l de-ionisiertem Wasser (pH 7,2) hergestellt. Der Permeabilisations-Puffer aus 1% hitzeinaktiviertem Rinderserum, 0,1% Saponin und 0,1% Natriumazid gelöst in PBS (Coulter Inc., Miami, FL, USA) wurde bei 4°C gelagert.

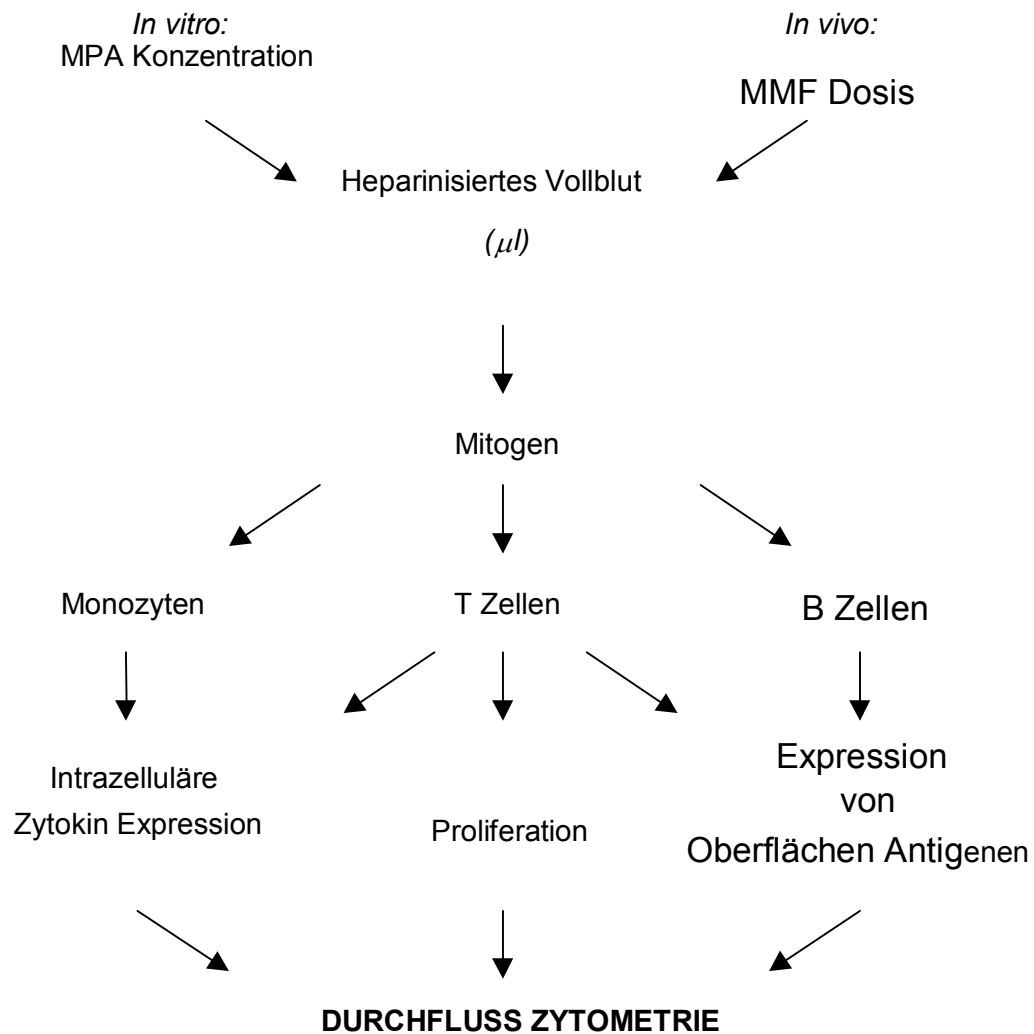


Abbildung 17: Pharmakodynamische Messungen der MMF Aktivität. In vitro wird Vollblut mit unterschiedlichen Konzentrationen von MPA versetzt, in vivo wird nach MMF Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten Vollblut entnommen. Nach mitogener Stimulation werden Aktivierung und Proliferation verschiedener Leukozyten mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt.

b) Mitogen - stimulierte Vollblut Assays

Zur mitogenen Stimulation von T Zellen wurde 80 µl heparinisiertes Vollblut 1:10 in Kulturmedium verdünnt und mit ConA zwischen 24 und 96 Stunden bei 37°C in einer 5% CO₂ wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Zur Stimulierung des Rattenblutes wurde 15 µg/ml ConA verwandt; das Primatenblut wurde mit 5 bis 7,5 µg/ml ConA stimuliert. Zur Bestimmung der intrazellulären Zytokin-Expression in T Zellen wurde 50 µl Vollblut mit 15 ng/ml PMA und 750 ng/ml IONO für 5 Stunden stimuliert und die Zytokin-Sekretion mit 10 µg/ml Brefeldin A blockiert.

Einhundert Mikroliter unverdünntes, heparinisiertes Primaten Vollblut wurde mit 20 µg/ml PWM für 24 Stunden stimuliert, um eine B Zell Aktivierung zu erzielen. Fünfundzwanzig Mikroliter unverdünntes, heparinisiertes Primaten Vollblut wurde mit 1 µg/ml LPS für 2 Stunden stimuliert um eine Monozyten Aktivierung zu erreichen.

c) Analyse der Lymphozyten Proliferation

Erythrozyten in dem ConA stimulierten Blut wurden lysiert (8 ml Lysat zu 800 µl verdünntem Blut, 10 min), die verbliebenen Zellen zentrifugiert (10 min, 1000 U/min), mit PBS gewaschen und mit 1% Formalin - Lösung für 5 Minuten fixiert. Nach Resuspension in Methanol (4°C, 10 min) wurden die Zellen erneut gewaschen und bei 37°C mit dem Permeabilisationspuffer, PI und anti-PCNA-FITC Ak für 25 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen in 0.5% Formalin-PI Lösung resuspendiert und bis zur Untersuchung bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

d) Analyse der Lymphozyten Oberflächen Aktivierungs-Antigene

Zweihundert Mikroliter 1:10 verdünntes, ConA stimuliertes bzw. 100 µl unverdünntes, PWM stimuliertes Blut wurde gewaschen, pelletiert und mit anti-Ratten bzw. anti-humanen monoklonalen Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Erythrozyten lysiert und mit 0.5% Formalin-PBS Lösung fixiert und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C lichtgeschützt

gelagert. Bei den Rattenexperimenten wurden für die 3-Farbenanalysen Biotin-konjugierte Antikörper verwendet und nach der primären Ak-Inkubation erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt mit Streptavidin-PECy5. Alle Protokolle enthielten einen Antikörper gegen Lymphozyten Untergruppen (FITC-CD3 bzw. FITC-OX52, PCP-CD3ε, PE-CD4, PE-CD8 oder PE-Cy5-CD20) um so eine spezifische Subgruppen-Analyse durchführen zu können.

e) Analyse der intrazellulären Zytokin-Bestimmung

Fünfundzwanzig Mikroliter unverdünntes, PMA und IONO stimuliertes Affenblut wurde mit anti-CD3ε-PCP Antikörper versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, fixiert (IntraPrep I, Immunotech, Marseille, Frankreich) und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit FITC- bzw. PE-Anti-Zytokin Antikörper behandelt, permeabilisiert (IntraPrep II, Immunotech, Marseille, Frankreich) und in einer 1% Formalin-PBS Lösung bis zu ihrer Verwendung bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

f) Analyse der Monozyten Funktion

LPS stimuliertes Blut (50 µl) wurde gemäß dem intrazellulären Lymphozytenprotokoll mit FITC-anti-CD14 und PE-anti-TNFα Antikörper behandelt, und für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

g) Durchfluss-Zytometrische Auswertung

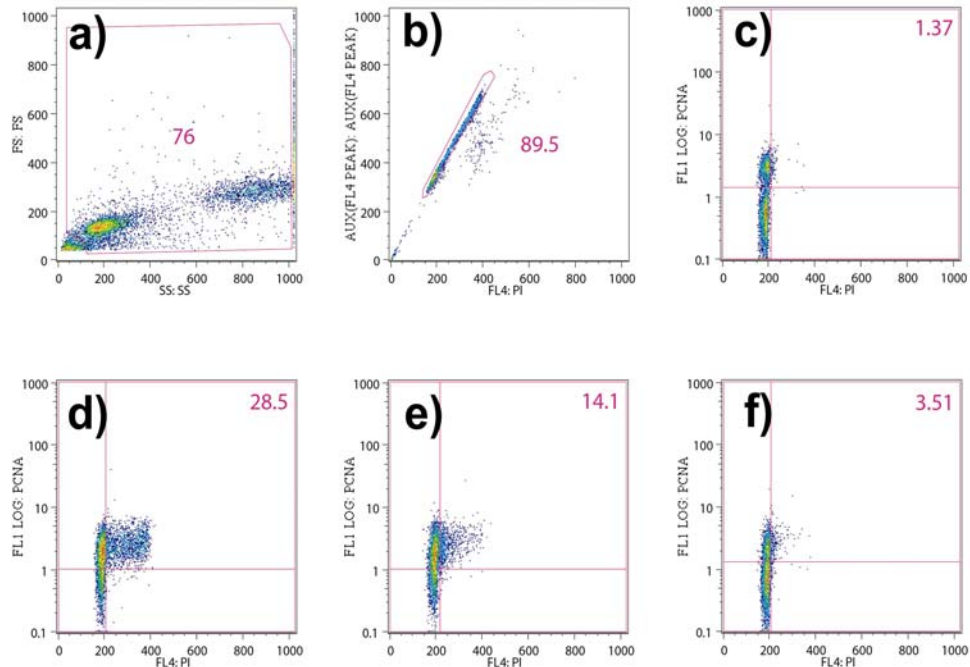


Abbildung 18: Analyse der mononucleären Proliferationsrate mittels Durchfluss-Zytometrie. a) FS/SS Scatter; 76% der Zellen wurden für die weitere Analyse (b) mit einbezogen. Hier wurden Zelldoublets und weiterer Debris aussortiert und die verbleibenden Zellen (89,5%) für die Bestimmung der Proliferationsrate benutzt. c) Unstimulierte unbehandelte Negativ - Kontrolle. Als proliferierende Zellen wurden solche gewertet die FITC-antiPCNA positiv und SG₂M positiv sind (1,37%). Nach ConA Stimulation (d) proliferierten 28,5% der Zellen (Positiv - Kontrolle, E₀). Bei Zugabe von 0,5 mg/l MPA (e) reduzierte sich die Proliferation um ca. 50% auf 14,1% (\approx IC₅₀) und bei einer Konzentration von 1,0 mg/l MPA (f) war die Proliferation fast vollständig gehemmt (3,5%).

Alle Analysen wurden auf einem Epics XL-MCL Durchflusszytometer (498 nm luftgekühltem Laser) der Firma Beckmann-Coulter (Fullerton, FL, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Zellen erfolgte innerhalb von 6 Stunden nach ihrer Präparation. Die abgegebenen Fluoreszenzen wurden in folgenden Bandbreiten registriert: FITC: 525 nm (505 – 545 nm), PE: 575 nm (555 – 600 nm) und PECy5, PCP, PI: 675 nm (660 – 700 nm).

Die tägliche Qualitätskontrolle erfolgte mit Hilfe von Beads und Einfarben-Analysen zur Geräte-Kompensation. Als Negativ-Kontrolle (E_{neg}) dienten Blutanalysen, die mit

inaktiven Antikörpern gleichen Isotyps behandelt wurden. Unspezifische Antikörperbindungen von maximal 1 - 3% wurden toleriert.

Zur Bestimmung der Leukozyten Proliferationsrate wurde Zell-Debris im FS/SS Scatter aussortiert (Abbildung 18a) und Zell-Doubletten im DNA – Peak / Integral Display (Abbildung 18) ausgegrenzt. Fünftausend Zellen pro Analyse wurden in einer 2 Farben-Analyse bestimmt. Die intrazelluläre FITC-PCNA Expression wurde logarithmisch bei 525 nm und der DNA-Gehalt linear bei 635 nm gemessen. Als positiv wurden Zellen gewertet, die sich in der S, G₂ oder M Phase ihres Zellzyklus befanden und PCNA exprimierten.

In Zwei- und Drei-Farben Protokollen wurden Oberflächen-Antigene und intrazelluläre Zytokine bestimmt. Im FS/SS Scatter wurden 5000 Lymphozyten bzw. 3000 Monozyten je Probe aufgrund ihrer typischen Morphologie (Shifrine et al., 1978) ausgewählt und von anderen Zellen und Debris getrennt. Die Expression getesteter Antigene erfolgte in den mit monoklonalen Antikörper markierten Subgruppen. Die multivariate Datenanalyse erfolgte mit der FlowJo[®] - Software (Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA). Die Daten wurden als Histogramme und als Zweifarben-Punktdiagramme dargestellt um positive Zellen zu werten.

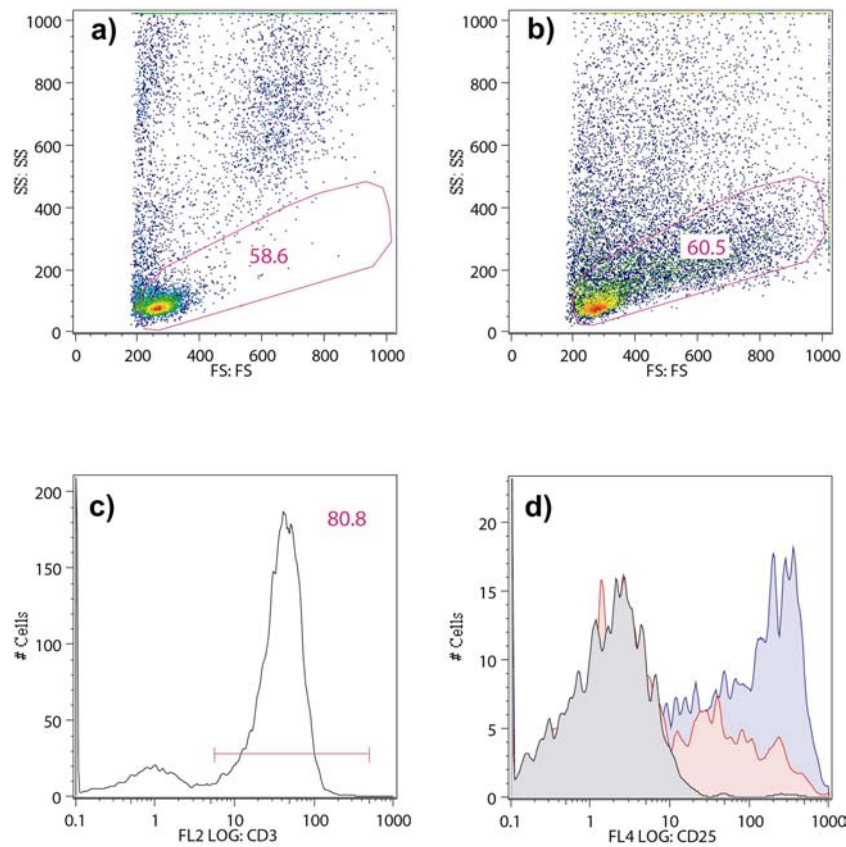


Abbildung 19: Bestimmung der Expression von Zelloberflächen Antigenen hier am Beispiel von CD25, dem Rezeptor von IL-2. Im FS/SS Scatter zeigen die Lymphozyten eine typische Morphologie im unstimulierten (a) und ConA stimulierten (b) Blut. Hieraus werden die Zellen für die weitere Analyse verwendet. Nach Subtypisierung im Histogramm auf CD3⁺ Zellen (c) wird die CD25 Expression bestimmt (d): Grau dargestellt das Ergebnis der unstimulierten Zellen (Negativ - Kontrolle), blau die stimulierten, unbehandelten Zellen (Positiv - Kontrolle) und rot stimulierte und mit 0,5 mg/l MPA inkubierte Zellen

Die absolute Prozentzahl antigen-präsentierender Zellen (E_{abs}) wurde *in vitro* zur Expression MPA unbehandelter Proben (E_0 , Positiv - Kontrolle) und *in vivo* zur Expression in den mit MMF unbehandelten Tieren vor Transplantation (E_0) normalisiert. Die normalisierte Antigen-Expression (E) ergibt sich somit aus folgender Formel:

$$E [\text{rel}\%] = (E_{\text{abs}} - E_{\text{neg}}) / E_0 * 100$$

Unter Inhibition (I) wird der Wert: $100 - E [\text{rel}\%]$ verstanden.

Entsprechend der Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) für MPA wurde der pharmakodynamische Effekt von MPA auf Zellproliferation und –aktivierung pro Zeiteinheit als Fläche unter der Effekt-Zeitkurve (AUE) mit der Trapez-Regel

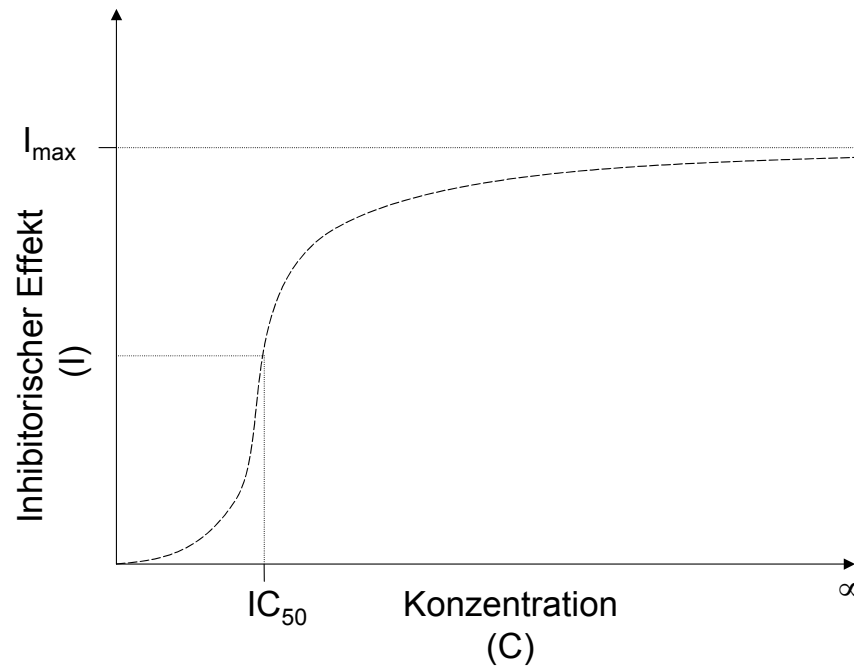


Abbildung 20: Sigmoidales pharmakodynamisches Modell zur Berechnung von IC_{50} und I_{max}

berechnet. Mit Hilfe der WinNonLin Software Vers 1.1 (Scientific Consulting Inc., Cary, NC, USA) wurde die MPA Konzentration bestimmt, die zu einer 50%igen Inhibition (IC_{50}) des berechneten maximalen inhibitorischen MPA-Effektes (I_{max}) führte. Hierfür wurde entsprechend den immunsuppressiven Eigenschaften von MPA bzw. MMF ein sigmoidales pharmakodynamisches Modell mit folgender Formel gewählt:

$$I = I_{max} * C^{\gamma} / (C^{\gamma} + IC_{50}^{\gamma})$$

Hierbei ist I die inhibitorische Aktivität auf eine Antigen Expression bei einer MPA Konzentration C , I_{max} der maximale Medikamenteneffekt bei $C = \infty$ und γ eine

Konstante, die die Steilheit der Kurve beschreibt und von der MPA Verteilung und Affinität bestimmt wird (Hill – Faktor).

3. *Hämatologische Analysen und Blutchemie*

Blutbild-Analysen wurden jeweils vor Versuchsbeginn, am Versuchsende und in Studie 301 zusätzlich alle 3 Wochen bzw. unter MMF Therapie einmal wöchentlich durchgeführt. In den Primaten Versuchen wurden zusätzlich zu den gleichen Zeitpunkten blutchemische Untersuchungen durchgeführt, die die Bestimmung von Gesamt-Eiweiß, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Triglyzeride, Cholesterin, AST, ALT, gGT, LDH und Lipase mit einschlossen. Blutelektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid) wurden unter MMF-Therapie in Studie 301 wöchentlich bestimmt.

G. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das SPSS Software Paket Vers. 10.0 (SPSS Corp., Birmingham, AL, USA) verwendet. Alle kontinuierlichen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standard Fehler (SEM) dargestellt. Zur Prüfung auf Unterschiede zwischen den Gruppen wurde bei gleichen Varianzen der Student's T-Test angewandt. Zwei unabhängige, nicht normal verteilte Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Abhängige Variablen sind mit dem T-Test oder dem Wilcoxon-Rangsummen-Test auf Unterschiede getestet worden. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine ANOVA Analyse mit der Levene Prüfung auf Homogenität verwendet. Im Falle homogener Subgruppen erfolgte die Post-Hoc Korrektur mit dem Bonferroni Test, ansonsten mit dem Dunnett's C Test. Bivariate Korrelationen wurden mit dem Pearson's Korrelations Faktor geprüft. Diskrete Daten sind mit dem Fisher's Exakt Test auf Unterschiedlichkeit getestet worden. In Studie 301 erfolgte die Prüfung der IVUS Ergebnisse auf Unterschiedlichkeit der Gruppen mit dem GLM Modell für wiederholte Messungen. Für alle Versuche wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

III. ERGEBNISSE

A. Studie 101

1. Allgemeine Ergebnisse

Keine der 24 mit MMF behandelten Ratten zeigte Toxizitätszeichen. Das Körpergewicht sank durch die wiederholten Blutentnahmen von 300 ± 3 g auf 286 ± 4 g nach 36 Stunden Versuchsdauer ($p < 0,01$). Ebenso zeigten die Tiere einen Abfall im Hämatokrit ($0,39 \pm 0,03$ auf $0,35 \pm 0,02$; $p < 0,01$). Die Leukozytenzahl blieb konstant ($11,9 \pm 0,3$ vs. $10,9 \pm 0,4$; $p = 0,1$).

2. Pharmakokinetik nach eintägiger Behandlung mit MMF

a) MPAPlasmaspiegel

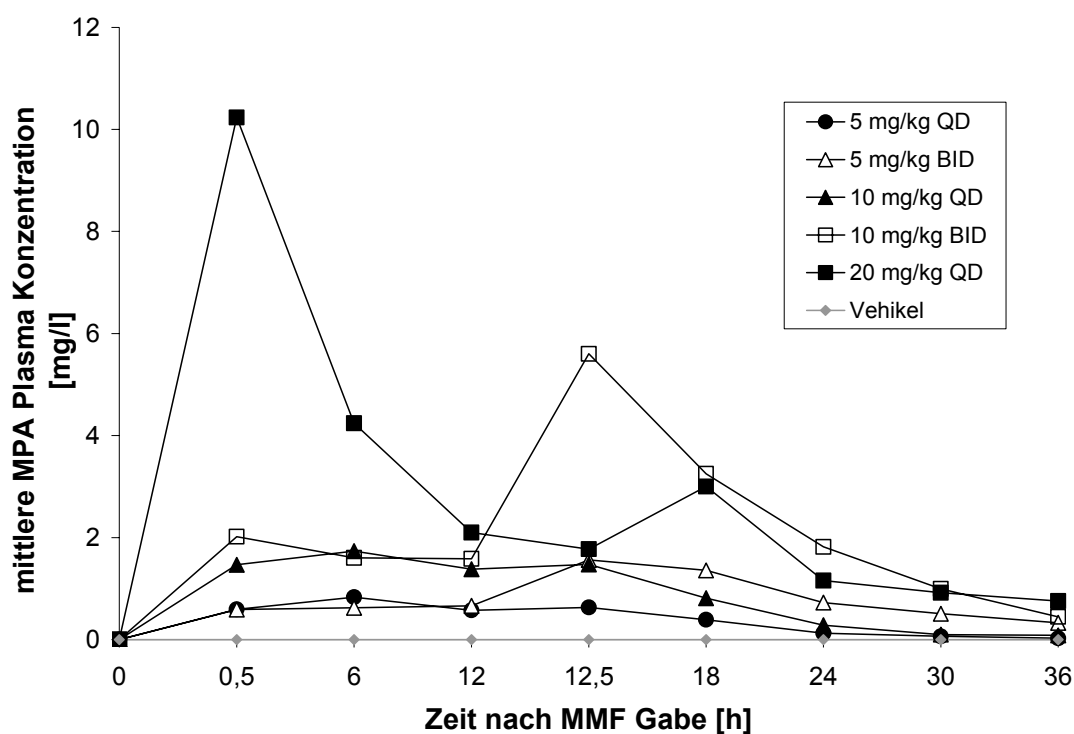


Abbildung 21: MPA Plasmaspiegel nach ein- bzw. zweimaliger oraler MMF Gabe in Lewis Ratten. Die MMF Gabe erfolgte nach den 0h und 12h Blutentnahmen. QD (Quaque Die) = einmal täglich, BID (Bis In Die) = zweimal täglich. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des Standardfehlers verzichtet

Im Detail sind die MPA Plasmaspiegel nach den verschiedenen Dosen und Dosierungsintervallen in Abbildung 21 dargestellt. Nach Erstgabe von 5 bis 20 mg/kg MMF wurden die Spitzenspiegel innerhalb von 30 Minuten nach Dosierung erreicht und lagen zwischen $0,6 \pm 0,1$ und $10,2 \pm 2,7$ mg/l. Spitzenspiegel und Dosis korrelierten signifikant ($r^2=0,80$, $p<0,01$); es zeigte sich jedoch ein überproportionales Ansteigen in der höchsten Dosisgruppe. Ein für die enterohepatische Zirkulation typischer zweiter Peak war nur in der 20 mg/kg QD Gruppe erkennbar.

Die MPA Exposition über die Zeit wird in Abbildung 22 dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der 5 mg/kg BID Gruppe ($22,16 \pm 1,8$ mg/l*h) und der 10 mg/kg QD Gruppe ($28,8 \pm 1,8$ mg/l*h).

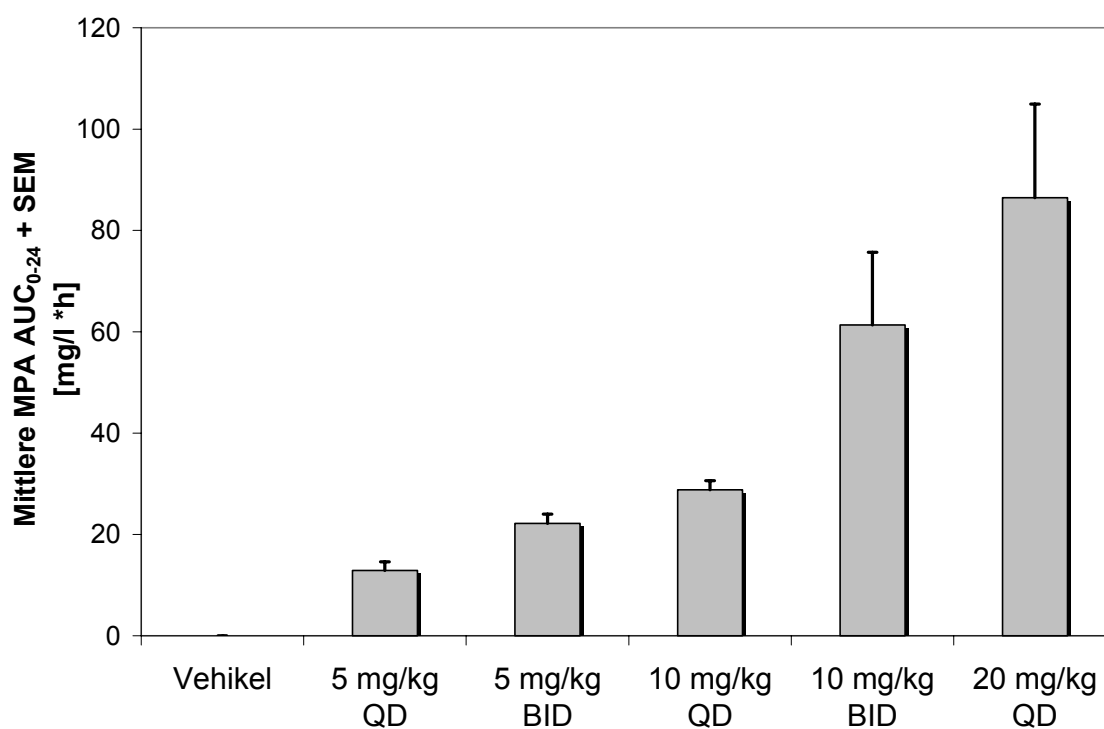


Abbildung 22: Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve 0-24h (AUC_{0-24}) als Parameter der MPA Exposition über einen Tag. Die AUC zeigte sich in Abhängigkeit von der Gesamt-Tagesdosis und nicht in Abhängigkeit vom Dosierungsintervall

Dagegen waren die Unterschiede der MPA-AUC₀₋₂₄ zwischen den Gruppen mit einer Gesamt-Tagesdosis von 10 mg/kg MMF und der 5 mg/kg QD Gruppe ($12,9 \pm 1,7$ mg/l*h; $p=0,03$) und der 10 mg/kg BID Gruppe ($61,4 \pm 14,3$ mg/l*h) statistisch signifikant ($p=0,03$). Es zeigte sich kein Unterschied innerhalb der Gruppen mit einer Gesamt-Tagesdosis von 20 mg/kg MMF.

b) MPAG Plasmaspiegel

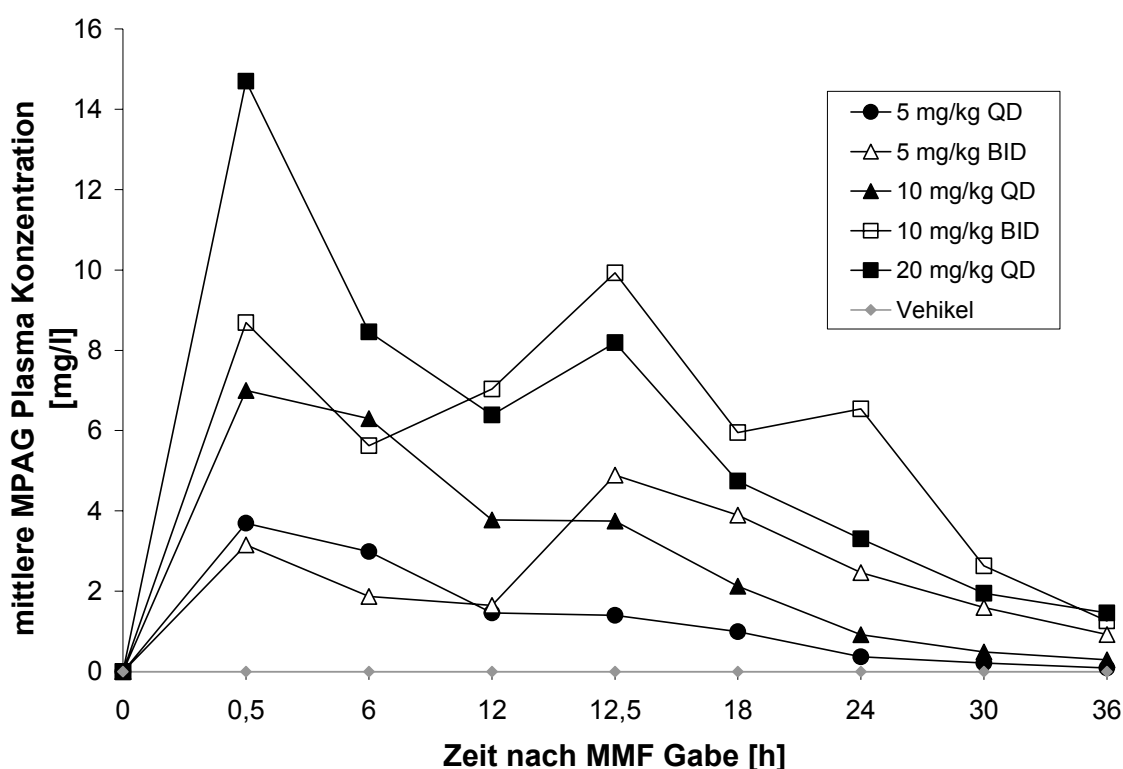


Abbildung 23: Mittlere MPAG Plasma Konzentrationen nach eintägiger Behandlung von Lewis Ratten mit MMF. In den QD Gruppen wurde MMF nach den 0h und in den BID Gruppen nach den 0h und 12h Blutentnahmen oral verabreicht. Wie bei den MPA Spiegeln entsprachen die Kurven in den ersten zwölf Stunden der Höhe der Erstdosis. Nach der Zweitgabe in den BID Gruppen lagen dann die jeweiligen BID Kurven höher als die der Gesamt-Tagesdosis entsprechenden QD Kurven.

3. Pharmakodynamik nach eintägiger Behandlung mit MMF

a) DNA Gehalt und PCNA Expression

Nach der Erstgabe von 5 mg/kg MMF kam es zu einer 60% Inhibition der Lymphozytenproliferationsrate innerhalb von 30 Minuten nach oraler Applikation. Bei höheren Dosen (10 – 20 mg/kg MMF) war die Lymphozytenproliferation maximal inhibiert. Dieser Effekt war jedoch entsprechend der Plasma-Halbwertszeit von MPA rasch reversibel und die Wirkung nach 5 mg/kg QD Gabe innerhalb von 18 Stunden wieder vollständig aufgehoben. Nach Gabe von 10 mg/kg QD kam es nach 24 Stunden zu einer weitgehenden Erholung der Proliferationsrate und die Lymphozyten waren nur noch zu 20% in ihrem Wachstum gehemmt.

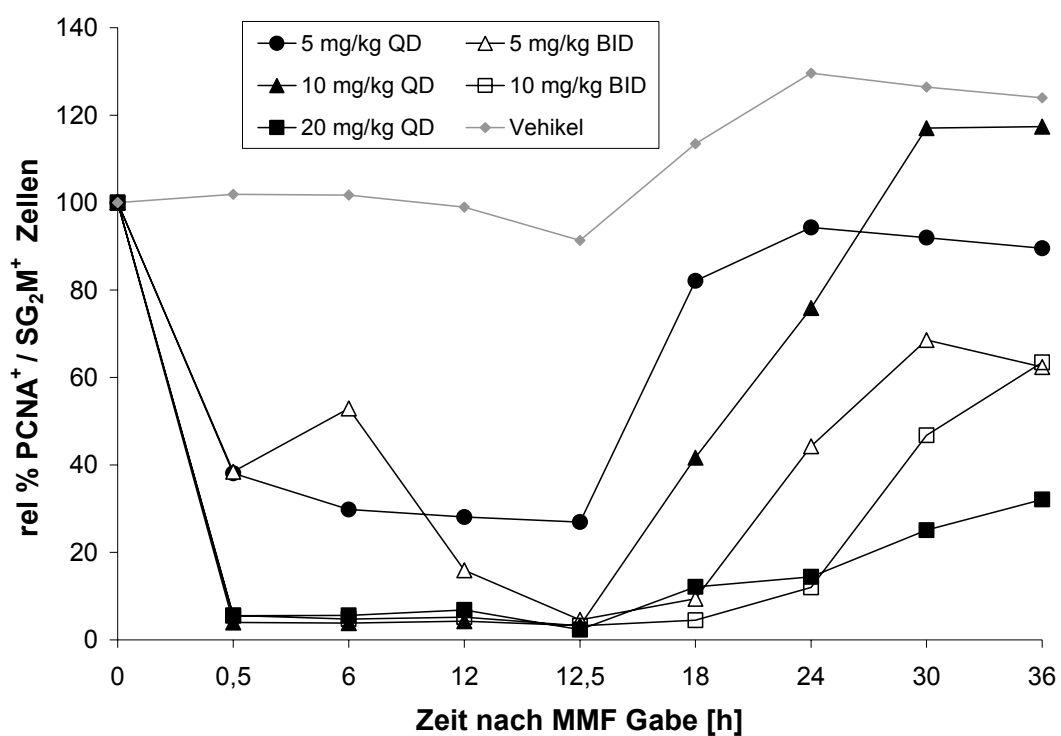


Abbildung 24: Hemmung der Proliferation von mononukleären Zellen nach der Gabe von MMF dargestellt als PCNA⁺/SG₂M⁺ Zellen. Alle Werte wurden zu dem Nullwert vor Behandlungsbeginn normalisiert

Die Verteilung der Gesamt-Tagesdosis auf zwei Einzeldosen erhöhte die Exposition und verlängerte die Wirksamkeit auf die Proliferationshemmung. Nach 36 Stunden zeigte sich auch in den beiden BID Gruppen eine Erholung der Proliferationshemmung auf ca. 40%

Inhibition und nach der Gabe von 20 mg/kg MMF QD war noch eine Inhibition von 68% zu verzeichnen.

b) Oberflächen Antigen - Expression auf T Zellen

MMF inhibierte nicht nur die Lymphozytenproliferation, sondern auch die T Zell Aktivierung durch Hemmung der Oberflächen Antigen Expression auf OX52⁺ Zellen. Innerhalb von 30 min nach Erstgabe wurde die IL-2 Rezeptor-Expression (CD25) dosisabhängig um $44,6 \pm 6,3\%$ (5 mg/kg MMF) bis zu $84,9 \pm 2\%$ (20 mg/kg MMF) gehemmt. Die Transferrin (CD71) Expression nahm bis auf $1,5 \pm 0,4\%$ ab und auch die Adhäsionsmoleküle LFA-1 (CD11a) und ICAM-1 (CD54) wurden in ihrer Expression auf T Zellen gehemmt. Alle Effekte von MMF waren rasch reversibel und 36 Stunden nach oraler Gabe normalisierten sich die Antigen-Expressionen wieder.

B. Studie 102

Nach den Ergebnissen der Studie 101 wurden die Dosisgruppen 5 mg/kg MMF BID und 10 mg/kg MMF QD für die Studie 102 ausgewählt. Diese Dosierung sicherte, entsprechend vorhergehenden Transplantationsstudien (Barten et al., submitted), die Entwicklung einer mäßiggradigen akuten Rejektion. Der Diagnostik-Zeitraum wurde auf 24 Stunden beschränkt und somit die Anzahl der Blutabnahmen reduziert.

1. Allgemeine Ergebnisse

Keines der Tiere zeigte nach 6 Tagen MMF Therapie Medikamententoxizität oder nahm an Gewicht ab. Der präoperative Hämatokrit ($0,39 \pm 0,03$) und der Hämatokrit am Tag 7 nach der letzten Blutentnahme ($0,38 \pm 0,05$) waren nicht signifikant unterschiedlich. Auch die Leukozytenzahl blieb konstant.

2. MPA Plasmaspiegel nach 6 Tagen MMF Therapie

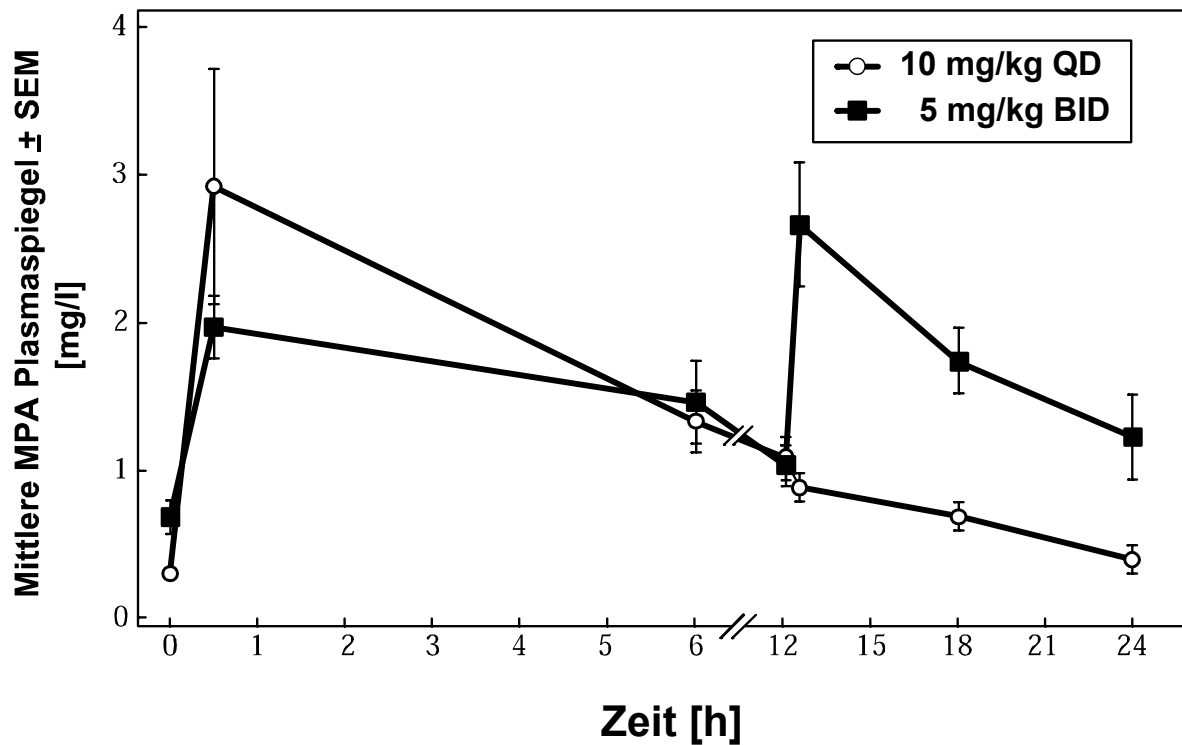


Abbildung 25: MPA Plasma-Spiegel an Tag 6 nach heterotoper Herztransplantation im Rattenmodell. Während den ersten 12 Stunden waren die MPA Spiegel in beiden Gruppen vergleichbar, unterschieden sich dann aber nach dem 12h Zeitpunkt

Am Tag 6 nach Transplantation war der mittlere Talspiegel in der 10 mg/kg MMF QD Gruppe ($0,3 \pm 0,03$ mg/l) signifikant niedriger als in der 5 mg/kg MMF BID Gruppe ($0,68 \pm 0,11$ mg/l; $p < 0,01$). Die Spitzenspiegel, 30 Minuten nach der Morgendosis, waren dagegen in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 25). Auch zu keinem anderen Zeitpunkt bis zur zweiten Dosis in der BID Gruppe (12h) unterschieden sich die Plasmaspiegel zwischen den Gruppen. Die AUC_{0-24} war in beiden Gruppen vergleichbar (QD: $29 \pm 3,6$ mg/l*h; BID: 39 ± 9 mg/l*h; $p = 0,3$).

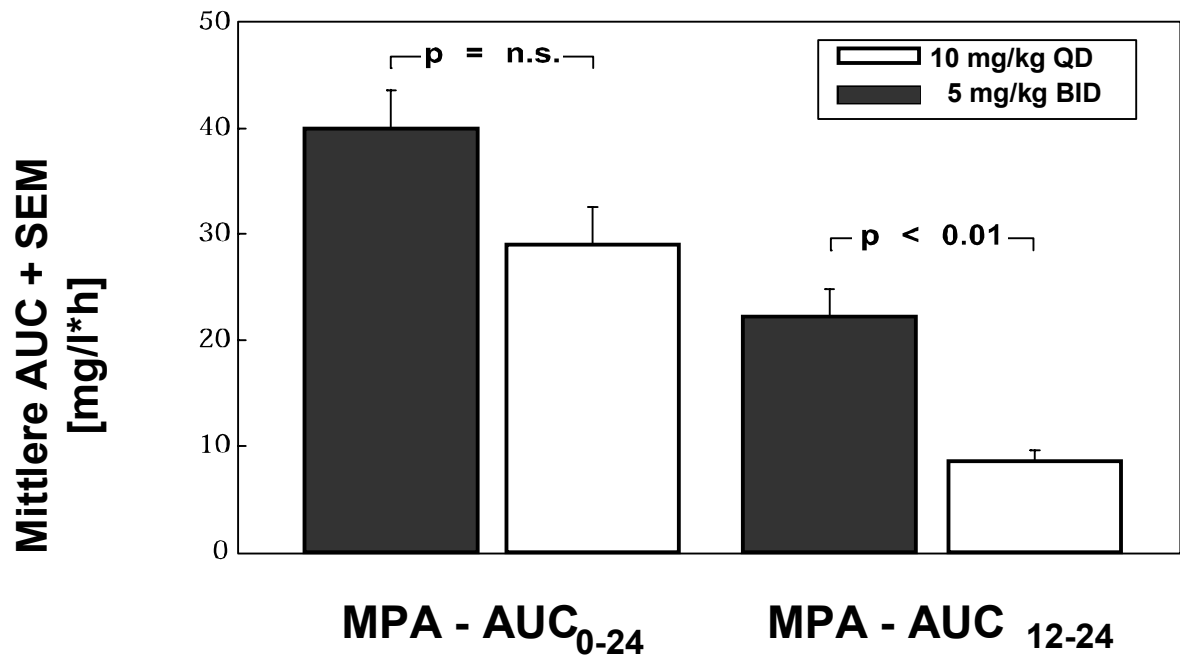


Abbildung 26: MPA - AUC nach 6 Tagen MMF Therapie. Während bei gleicher Tagesdosis die Gesamt-AUC in beiden Gruppen identisch war, kam es durch Aufteilung der Gesamtdosis in 2 Einzeldosen zu einer signifikanten Erhöhung der AUC₁₂₋₂₄ in der 5 mg/kg MMF BID Gruppe

Nach der zweiten MMF Gabe, 12 Stunden nach der Morgendosis, waren die MPA-Spiegel und die AUC₁₂₋₂₄ ($22,2 \pm 2,6$ mg/l*h) in der BID Gruppe signifikant höher als in der QD Gruppe ($8,6 \pm 0,98$ mg/l*h; $p < 0,01$) (Abbildung 26).

3. Pharmakodynamik von MMF nach wiederholten Dosierungen

a) DNA Gehalt und PCNA Expression

Unabhängig von der Höhe der MMF Einzeldosis wurde die Lymphozytenproliferation am stärksten 30 Minuten nach MMF Gabe gehemmt. Auch nach multiplen MMF Dosierungen, sechs Tage nach Therapiebeginn, war in dieser Studie die Proliferationshemmung ebenfalls schnell reversibel. In der Gruppe mit dem kürzeren Dosierungsintervall (5 mg/kg MMF BID) war auch bei nur halb so großen Einzeldosen die Hemmung der Lymphozytenproliferation zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung signifikant höher als in der 10 mg/kg MMF QD Gruppe. Insbesondere 18 Stunden nach Morgendosis war der Unterschied mit einer PCNA/SG₂M Expression von $15,7 \pm 3,7\%$ in der 5mg/kg MMF BID Gruppe und von $60,3 \pm 3,9\%$ in der 10 mg/kg MMF QD Gruppe am größten ($p < 0.001$).

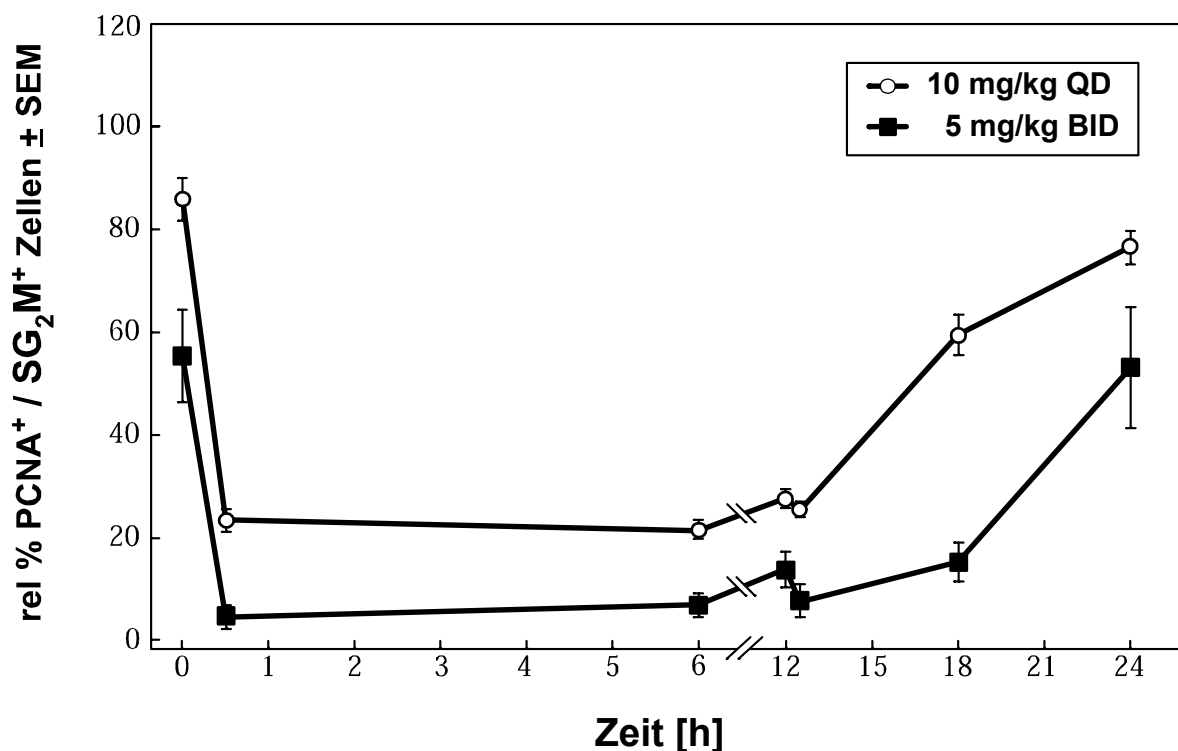


Abbildung 27: Lymphozyten – Proliferationshemmung durch MMF. Auch nach 6 Tagen Therapie war die MMF Wirkung rasch reversibel. Zum Zeitpunkt des MPA Talspiegels war die PCNA Expression in Zellen, die sich in ihrer S, G₂ oder M Phase des Zellzyklus befanden, in der 10 mg/kg QD Gruppe nur noch um 14% reduziert.

b) MMF Einfluss auf Lymphozyten Aktivität

Wie nach Erstgabe kam es auch nach multiplen Gaben von MMF zu einem raschen Rückgang der MMF Wirkung und die hemmende Wirkung auf die Lymphozytenaktivität war schnell reversibel. Die Transferrin Expression auf T Zellen wurde von 5 mg/kg MMF und 10 mg/kg MMF innerhalb von 30 Minuten in gleicher Weise maximal unterdrückt (CD71 Expression: 10 mg/kg MMF QD: $15,6 \pm 2,6 \%$; 5 mg/kg MMF BID: $15,5\% \pm 1,9\%$). Während es allerdings in der QD Gruppe zu einer kompletten Revision der MMF Wirkung zu den Zeitpunkten mit MPA-Talspiegeln kam ($108 \pm 10\%$), blieb in der 5 mg/kg MMF BID die CD71 Expression auf $56,5 \pm 5\%$ reduziert ($p < 0,001$). In gleicher Weise stellte sich der MMF Effekt für die CD25, CD11a und CD54 Expression dar.

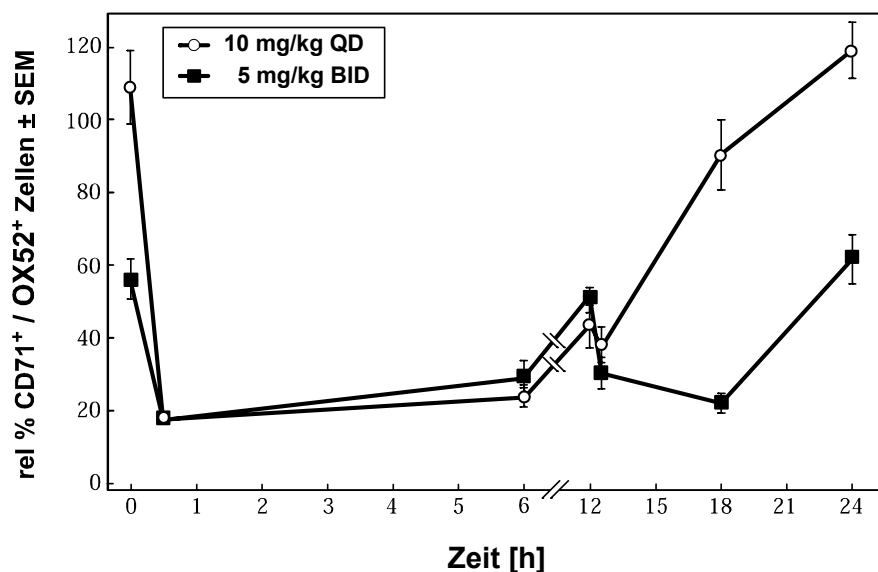


Abbildung 28: Expression des Transferrin Rezeptors CD71 auf T Lymphozyten. Während die Behandlung mit 10 mg/kg MMF QD zu einer insuffizienten Immunsuppression in der zweiten Hälfte des Dosierung - Zeitraumes führte, resultierte aus der Gabe von 5 mg/kg MMF BID eine mindestens 50% Reduktion der CD71 Expression zu allen Zeitpunkten

Bei der Berechnung der AUE₀₋₂₄ zeigte sich, dass die BID Gruppe einen stärkeren pharmakodynamischen Effekt nicht nur für die Proliferationsrate, sondern auch für die Expression der Aktivierungsmarker CD71 und CD25 aufzeigte (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung der pharmakodynamischen Unterschiede zwischen der 10 mg/kg MMF QD und der 5 mg/kg MMF BID Gruppe; Während sich an pharmakokinetischen Parametern nur die MPA-AUC₁₂₋₂₄ nicht aber die AUC₀₋₂₄ unterschied, führte die Aufteilung der MMF Gesamtdosis in zwei Einzeldosen zu einem signifikant höherem pharmakodynamisch, gemessenen immunsuppressiven Effekt über den gesamten 24 Stunden Zeitraum (Student's T-Test, Signifikanzniveau 0,05).

PD Messwerte	p – Wert
E₀ PCNA/DNA	0,01
E₀ CD71	0,001
E₀ CD25	n.s.
E₀ CD11a	n.s.
E₀ CD54	0,03
AUC₀₋₂₄ PCNA/DNA	0,001
AUC₀₋₂₄ CD71	0,003
AUC₀₋₂₄ CD25	0,03
AUC₀₋₂₄ CD11a	n.s.
AUC₀₋₂₄ CD54	n.s.

4. Korrelationen zwischen PK, PD und Rejektionsgrad

Die MMF Therapie reduzierte die Schwere der auftretenden Rejektionen, war jedoch in den verabreichten Dosierungen und Dosierungsintervallen nicht in der Lage eine Rejektion komplett zu verhindern. Die Aufteilung der Gesamt-Tagesdosis von 10 mg/kg MMF in zwei Einzeldosen von je 5 mg/kg MMF führte zu einem signifikant ($p < 0,001$) niedrigeren Rejektionsgrad (10 mg/kg MMF QD: 2 (1,5 – 2); 5 mg/kg MMF BID: 0.75 (0.75 – 1)).

Tabelle 2: Korrelationen zwischen Schwere der Rejektion, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern 7 Tage nach heterotoper Herztransplantation und MMF Therapie im Rattenmodell..

	Rejektionsgrad	
PK Meßwerte	Pearsons Korrelations Koeffizient	p - Wert
C₀ MPA	0,7	0,01
MPA-AUC₀₋₂₄	0,45	n.s.
MPA-AUC₁₂₋₂₄	0,78	0,005
PD Meßwerte		
E₀ PCNA	0,66	0,02
E₀ CD71	0,82	0,002
E₀ CD25	0,37	n.s.
E₀ CD11a	0,46	n.s.
E₀ CD54	0,69	0,01
PCNA AUE₀₋₂₄	0,85	0,001
CD71 AUE₀₋₂₄	0,81	0,002
CD25 AUE₀₋₂₄	0,64	0,03
CD11a AUE₀₋₂₄	0,27	n.s.
CD54 AUE₀₋₂₄	0,49	n.s.

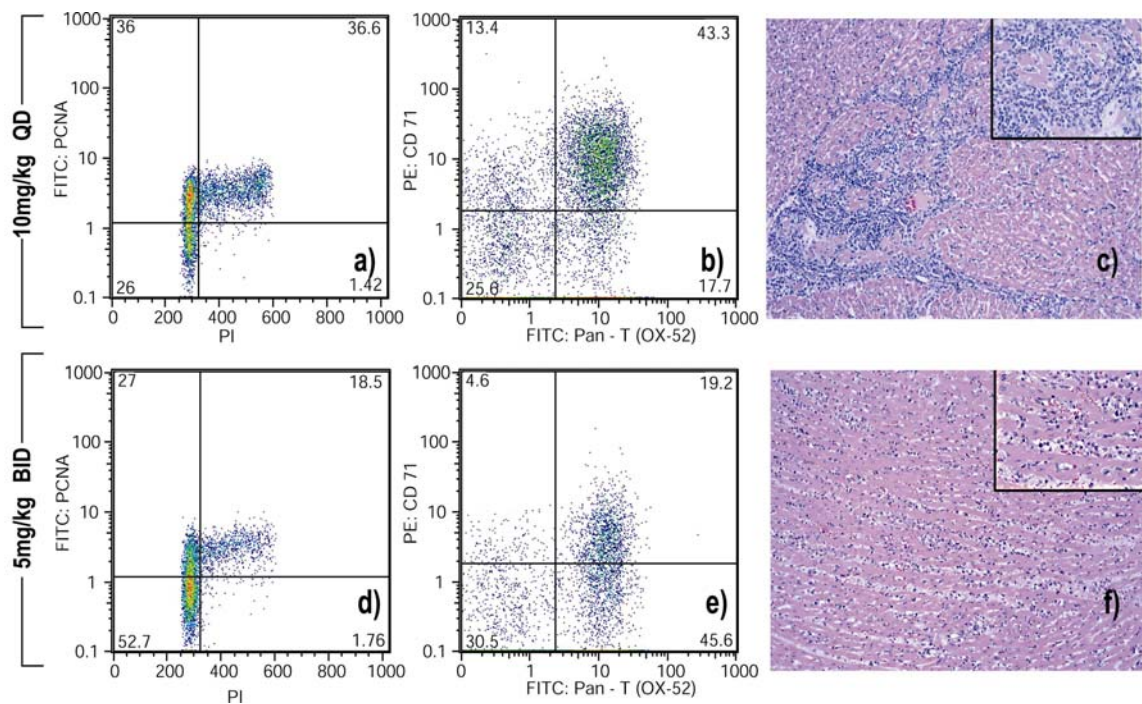


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen den pharmakodynamischen Effekten von MMF und der Schwere des Rejektionsgrades in der Histologie nach heterotoper Herztransplantation im BN – LEW Rattenmodell. Die Abbildungen a) bis c) sind repräsentativ für die 10 mg/kg MMF QD Gruppe, die Abbildungen d) bis f) für die 5 mg/kg MMF BID Gruppe. Nach ConA Stimulation korrelierten zum Zeitpunkt der MPA-Plasma-Talspiegel (E_0) die Proliferationsrate (a + d), dargestellt als PCNA⁺/SG2M⁺ Zellen, und die Expression von CD71⁺ auf OX52⁺ Zellen (b + e) mit dem Rejektionsgrad (c: Grad: 2; f: Grad 1) in der Histologie (HE Färbung, Vergrößerung 100 - 400x).

MPA Talspiegel korrelierten nur schwach ($r^2 = 0.7$, $p = 0.01$) und die Gesamt - MPA-AUC₀₋₂₄ korrelierte nicht mit der Schwere der Abstoßungsreaktion. Im Gegensatz dazu, korrelierten die AUE₀₋₂₄ für Lymphozytenproliferation, CD71 und CD25 Expression, hoch mit dem Rejektionsgrad (Tabelle 2 und Abbildung 29).

C. Studie 201

1. Allgemein

Vier Cynomolgus Affen (P1 – P4) wurden in diese PK/PD – Toxizitäts-Studie eingeschlossen und erhielten zu Beginn 100 mg/kg MMF p.o. einmal täglich (QD). Danach wurde die Dosierung individuell bei jedem Tier entsprechend der Tolerabilität angeglichen. Nach Beendigung der Studie erholten sich alle Tiere rasch.

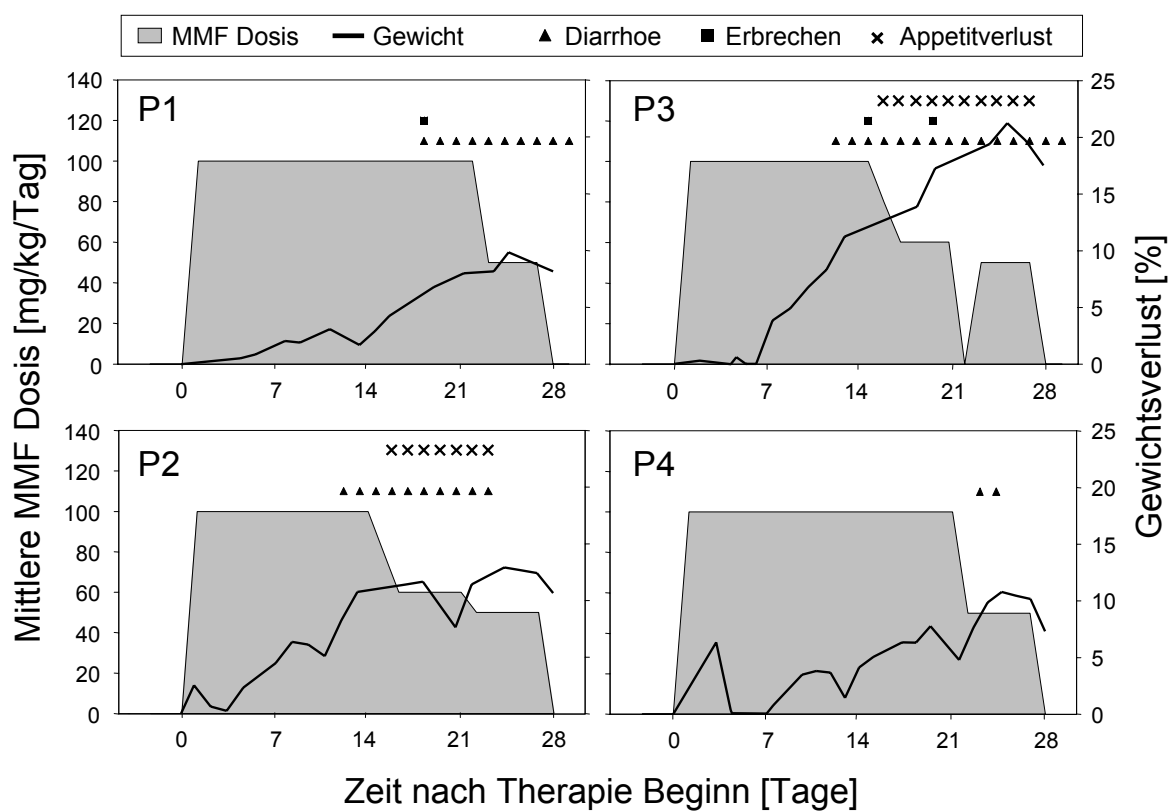


Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Studie 201. Für jeden Cynomolgus Affen (P1 – P4) ist ein eigener Graph angelegt, der die individuelle orale MMF Dosis (QD) und die Toxizitätszeichen zeigt. Alle Tiere hatten Gewicht verloren und zeigten eine Diarrhoe. Daher wurde in den Tieren P2 und P3 nach 14 Tagen, und in den restlichen Tieren nach 3 Wochen die initiale Dosis reduziert. Bei P3 mußte die MMF Therapie für einen Tag pausiert werden. Nach Absetzen der Therapie erholten sich alle Tiere rasch.

2. MMF Toxizität im *Cynomolgus* Affen

Nach oraler Gabe von 100 mg/kg MMF einmal täglich traten bei allen Tieren Toxizitätszeichen auf (Abbildung 30). Alle Tiere hatten signifikant an Gewicht verloren und am 21. Tag der Studie lag der mittlere Gewichtsverlust bei 11,6% (7,6% - 19,4%; $p < 0,02$ im Vergleich zum Gewicht vor Therapiestart). Nach Dosisreduktion kam es sofort wieder zu einer Gewichtszunahme, und nach Therapieende kehrten alle Tiere wieder zu ihrem Ausgangsgewicht zurück.

Unter dem Gewichtsverlust war bei 2 Tieren der Appetit unverändert normal und bei 2 Tieren ab Tag 16 reduziert. Zwei Tiere hatten an einzelnen Tagen während des Versuches erbrochen. Bei allen Tieren trat eine Diarrhoe auf, deren Ausmaß individuell unterschiedlich war und zwischen 2 und 15 Tagen andauerte. Auch die Diarrhoe war nach Absetzen der MMF Medikation rasch reversibel.

Die hämatologischen Parameter veränderten sich deutlich, aber nicht statistisch signifikant, nach der MMF Therapie. So fielen der Hb von $12,4 \pm 0,5$ mg/dl auf $11,1 \pm 1,0$ mg/dl ($p = 0.1$), die Leukozyten von $9,3 \pm 1,3$ auf $7,4 \pm 1,2$ ($p = 0,07$) und der Lymphozytenanteil von $43,5 \pm 5\%$ auf $36 \pm 6\%$ ($p = 0.08$).

Aufgrund den Medikamenten Nebenwirkungen wurde an Tag 14 bei den Tieren P2 und P3 die MMF Dosis zunächst auf 60 mg/kg reduziert. Während sich der Gewichtsverlust bei P2 verlangsamte, war dieser bei P3 weiter progredient, so dass bei zusätzlichem Auftreten von Diarrhoe und Erbrechen die MMF Medikation zwischenzeitlich ausgesetzt werden mußte. Nachdem an Tag 21 auch bei dem letzten Tier eine Diarrhoe auftrat, wurde bei allen Tieren die Gesamtdosis auf 50 mg/kg reduziert. Unter dieser Reduktion waren sämtliche Toxizitätszeichen reversibel.

3. Pharmakokinetik nach oraler Gabe von MMF

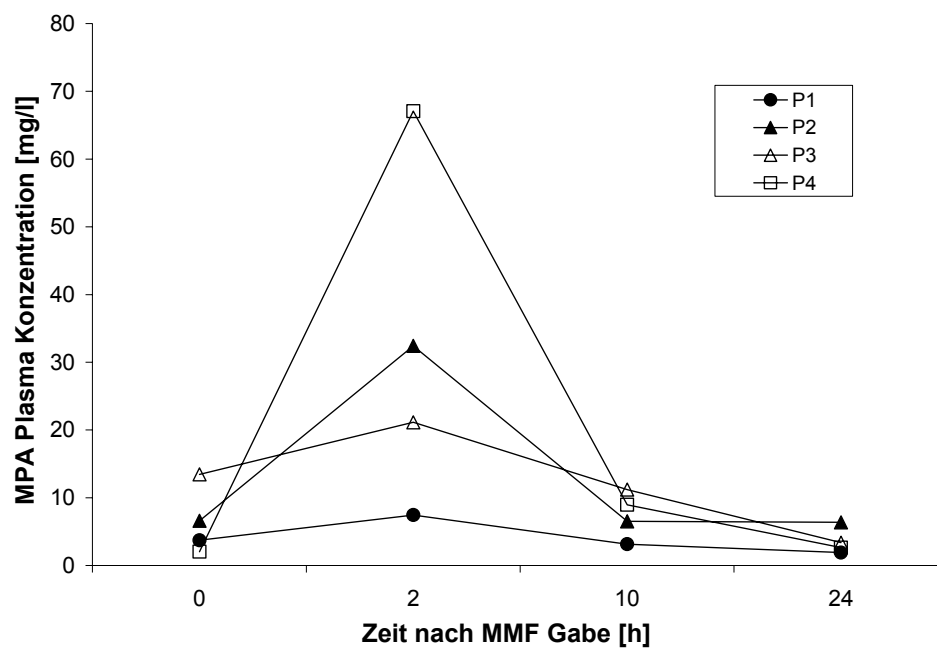


Abbildung 31: Erstgabe von 100 mg/kg MMF oral in Form einer MMF Pulver Suspension in Vehikel Lösung. Die Tiere zeigten große Unterschiede in den erzielten MPA Spiegeln.

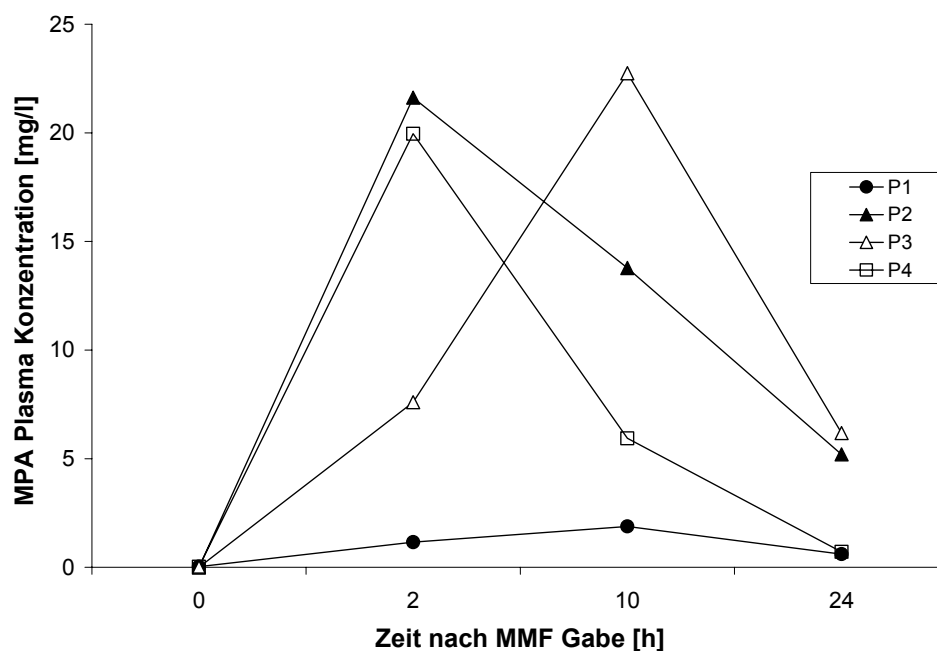


Abbildung 32: Individuelle MPA Plasmaspiegel nach 7 Tagen oraler MMF Therapie (100 mg/kg QD) zeigte ein Fortbestehen der hohen inter-individuellen Variabilität.

Nach der Erstgabe von 100 mg/kg MMF, hergestellt aus purem MMF Pulver und suspendiert in einer Vehikel-Lösung, kam es zu großen Resorptionsunterschieden bei den Tieren: Zwei Tiere zeigten die höchsten MPA Spiegel nach 2 Stunden und zwei weitere Tiere erst 10 Stunden nach oraler MMF Gabe. Aufgrund der wenigen Meßzeitpunkte konnte kein T_{\max} und C_{\max} bestimmt werden. Die höchsten, gemessenen MPA Spiegel variierten zwischen 1,8 und 22,8 mg/l (Abbildung 31).

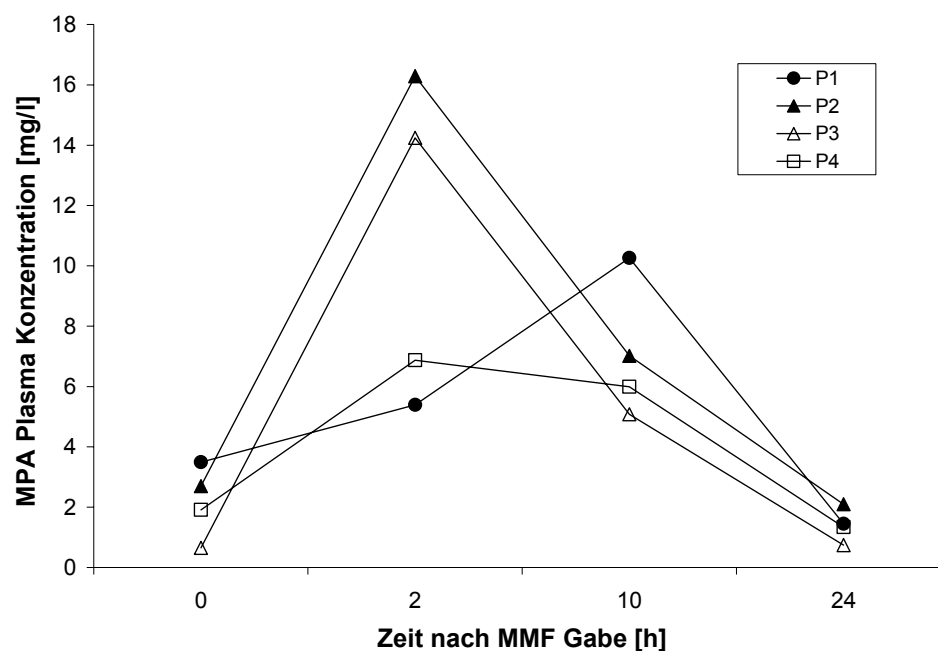


Abbildung 33: Individuelle MPA Plasmaspiegel am Tag 28 der Studie 201, nach 7 Tagen Therapie mit 50 mg/kg MMF QD.

Auch nach 7 Tagen oraler MMF Therapie mit 100 mg/kg (Abbildung 32) verringerte sich die Variation in den erzielten MPA Spiegel nicht. Die Talspiegel lagen zwischen 1,9 mg/l und 13,6 mg/l. Am letzten Tag der Studie am Tag 28 lagen die MPA - Talspiegel nach sieben tägiger Therapie mit 50 mg/kg MMF QD (Abbildung 33) zwischen 0,6 mg/l und 3,6 mg/l.

4. *Pharmakodynamik nach oraler QD Gabe von MMF*

Im Rahmen der Studie 201 wurden die pharmakodynamischen Methoden für das Primatenmodell im Cynomolgus Affen entwickelt. Die Ergebnisse der verschiedenen mitogenen Stimulationsarten, der Testung der anti-humanen Antikörper auf Kreuzreaktivität mit den Cynomolgus Antigenen und der Abwandlungen der labortechnischen Protokolle werden hier nicht aufgezeigt.

Die pharmakodynamische Beurteilung der Inhibition von MMF auf die Lymphozytenproliferationsrate wurde anhand der Bestimmung des DNA-Gehaltes durchgeführt, da zum Zeitpunkt dieser Toxikologie-Studie die PCNA Methode noch nicht validiert war.

Nach der ersten Einzeldosis von 100 mg/kg MMF variierte der Einfluss von MMF auf die Lymphozytenproliferation entsprechend den unterschiedlichen MPA – Plasmaspiegeln. Demnach wurden 2 Stunden nach Gabe minimale Proliferationsraten von 17,3% bis 34,2% erreicht. Nach 7 Tagen Therapie zeigte sich dann aber unabhängig von der Variation der MPA Plasmaspiegel, eine maximale Inhibition der Proliferationsrate zu allen Zeitpunkten der Analyse. Diese lag zwischen $8,6 \pm 1,5\%$ und $15,5 \pm 6\%$ SG₂M Expression.

Vergleicht man die PK und PD Werte nach kontinuierlicher Gabe von 100 und 50 mg/kg MMF (Abbildung 34) so erkennt man, dass mit der geringeren Dosierung kein vollständiger immunsuppressiver Effekt über den gesamten Dosierungszeitraum zu erzielen war. Die Lymphozytenproliferation war in der 50 mg/kg QD Gruppe nur zum 2h Zeitpunkt maximal gehemmt und zeigte eine deutliche Erholung zu den anderen Meßzeitpunkten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen an den Zeitpunkten 0h, 10h, und 24h verfehlten die statistische Signifikanz nur knapp ($p = 0,068$).

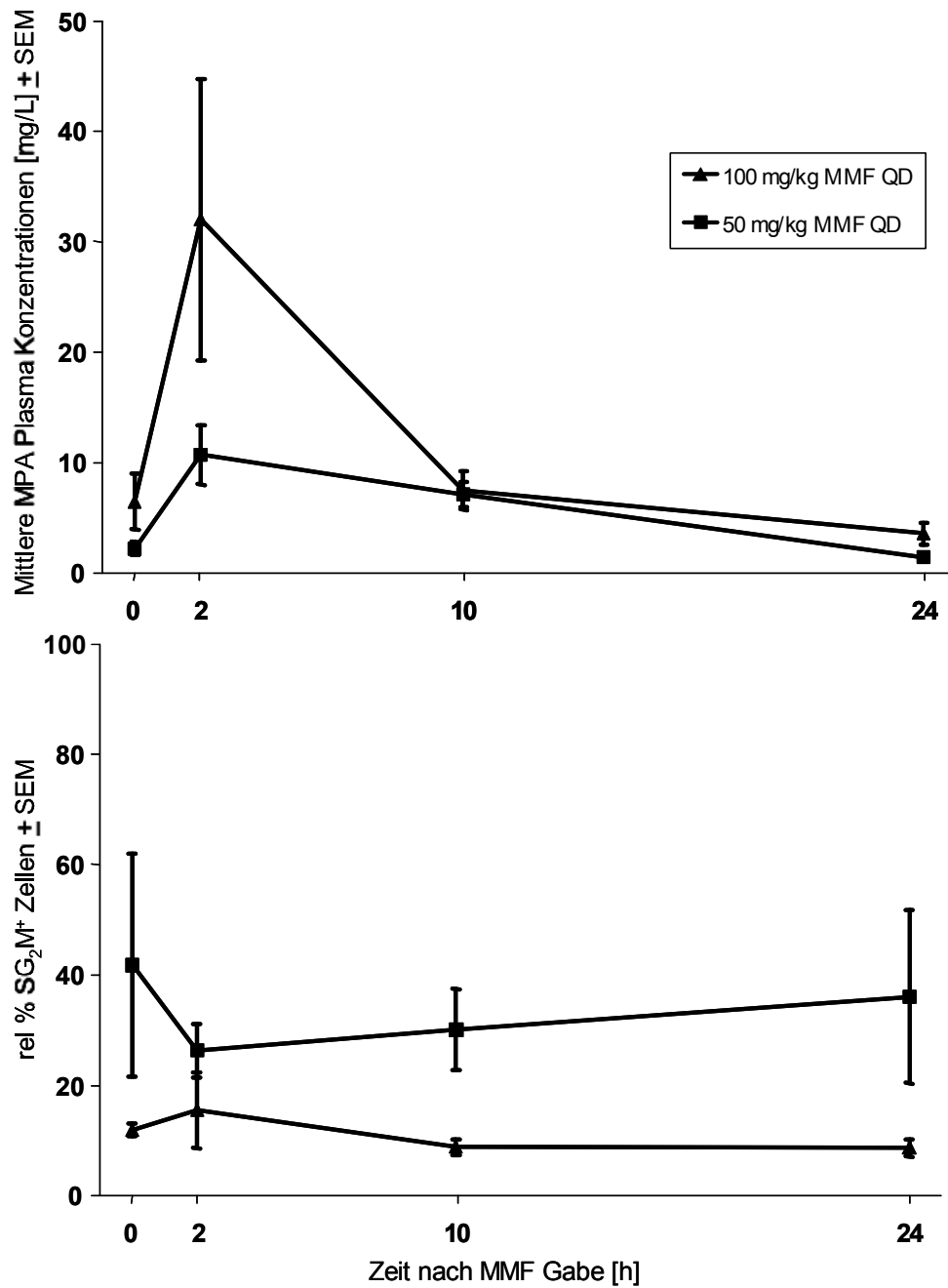


Abbildung 34: Vergleich von den oralen MMF Dosisgruppen 50 mg/kg QD und 100 mg/kg QD; oben MPA Plasmaspiegel und unten die Lymphozyten-Proliferationsrate gemessen anhand der SG₂M Expression. Während die höhere Dosis zwar zu sehr variablen MPA Plasmaspiegeln, aber zu einem maximalen immunsuppressiven Effekt über den 24 Stunden Zeitraum führte, waren die niedrigeren Plasmaspiegel in der 50 mg/kg QD Gruppe mit einer submaximalen Inhibition der Lymphozytenproliferation vergesellschaftet.

Einen vergleichbaren Effekt zeigte MMF auf die Lymphozytenfunktionen: So wurde die Expression von CD25 auf CD3⁺ Zellen durch die wiederholte Gabe von 100 mg/kg MMF einmal täglich bis zu ihrem Maximum inhibiert und zeigte im Tagesverlauf relative Expressionsraten zwischen $16,9 \pm 3,2\%$ und $21,1 \pm 3,1\%$. Nach der Gabe von 50 mg/kg MMF QD erholten sich die CD25 Expressionsraten zum Zeitpunkt der niedrigsten MPA Plasmaspiegel auf $E_0 = 39,4 \pm 9,5\%$ ($p = 0,068$).

Auch die CD71 Expression auf CD3⁺ Lymphozyten wurde MMF-Dosis und MPA-Plasmaspiegel abhängig im Primaten inhibiert. Der Effekt war jedoch im Vergleich zur Hemmung der Lymphozytenproliferation und der CD25 Expression nicht so ausgeprägt und minimale Expressionsraten von $32,5 \pm 2,3\%$ wurden erreicht.

D. Studie 202

1. Allgemein

In Studie 202 erhielten zwei Tiere (P5, P6) für die Dauer von 14 Tagen eine Gesamt-Tagesdosis von 100 mg/kg CellCept-IV[®] subkutan appliziert, die in zwei Einzeldosen aufgeteilt wurde (BID). Die Pharmakokinetik wurde mit der oralen Applikation von CellCept-IV[®] in vier Tieren (P5 – P8) verglichen. Alle Tiere tolerierten diese Studie gut. Örtliche Hautreizungen der subkutanen CellCept-IV[®] traten nicht auf.

2. Pharmakokinetik nach subkutaner MMF BID Applikation

Innerhalb von 2 Stunden nach subkutaner Erstgabe wurden suffiziente MPA-Plasmaspiegel von 10,6 – 11,9 mg/l erreicht. Auch die 12h und 24h Talspiegel lagen mit 1,8 bis 4,8 mg/l in einem Bereich, der als therapeutisch wirksam angesehen wird.

MPAG-Plasmaspiegel lagen nach 2 Stunden bei 12,8 mg/l und 20,1 mg/l, nach 12 Stunden bei 2,9 mg/l und 9,7 mg/l und nach 24 Stunden bei 5,1 und 8,1 mg/l.

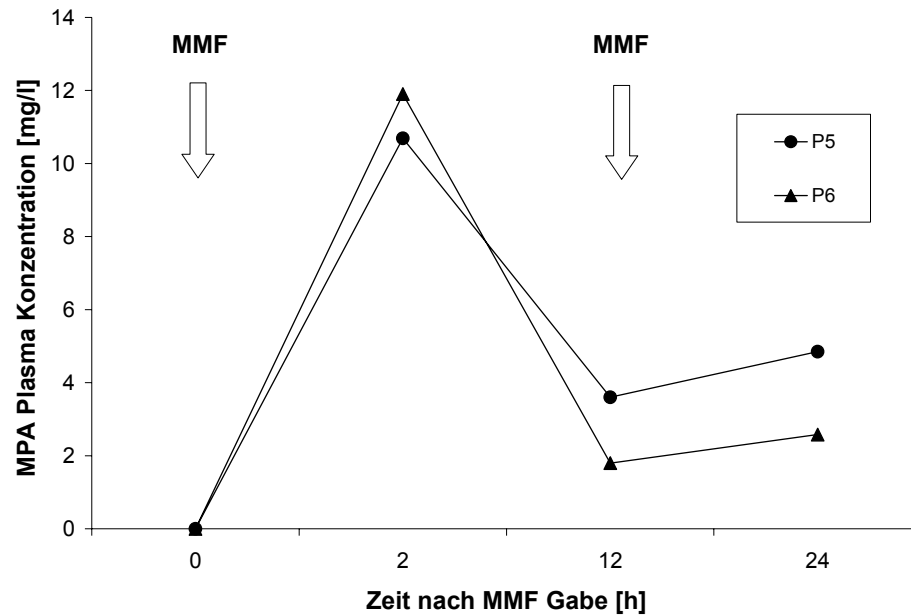


Abbildung 35: Erstapplikation von 50 mg/kg CellCept-IV® BID subkutan am Primaten. Effektive MPA Plasmaspiegel wurden innerhalb von 2 Stunden erreicht.

Nach 14 tägiger Therapie mit 50 mg/kg CellCept-IV® BID subkutan wurden konstante Talspiegel von 6,03 mg/l bis 9,4 mg/l erreicht. Es wurden keine Spitzenspiegel von mehr als 14,5 mg/l verzeichnet.

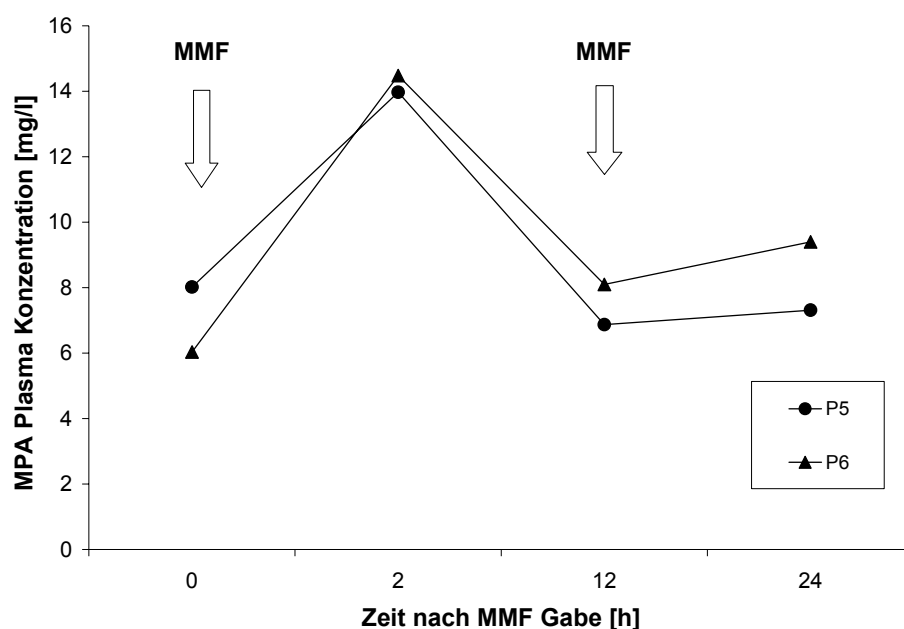


Abbildung 36: MMF Pharmakokinetik nach 14 Tagen 50 mg/kg CellCept-IV® subkutaner BID Therapie.
Gleichmäßige MPA Plasmaspiegel

3. Toxizität nach subkutaner MMF Applikation

Am Ende der Studie lag der maximale Gewichtsverlust bei 9,4% und bei 7,3%. Ein Tier erbrach am Studienbeginn nach Ketamingabe und ein Tier entwickelte am Tag 10 eine Diarrhoe. Der Appetit war zu jeder Zeit unbeeinträchtigt. Andere Begleiterscheinungen der MMF Therapie traten nicht auf.

4. Pharmakokinetik nach oraler Gabe von CellCept-IV[®]

Nach oraler Applikation von 50 mg/kg CellCept-IV[®] kam es bei 3 von 4 Tieren innerhalb von 2 Stunden zu einem suffizienten MPA Plasmaspiegel zwischen 2,2 und 5,5 mg/l. Ein Tier zeigte keine erkennbare Resorption und es wurden zu keinem Zeitpunkt Plasmaspiegel von mehr als 0,3 mg/l bestimmt. Bei den anderen Tieren lagen die Talspiegel nach 12 h zwischen 1,6 und 4,1 mg/l und nach 24 h zwischen 2,7 und 7,9 mg/l

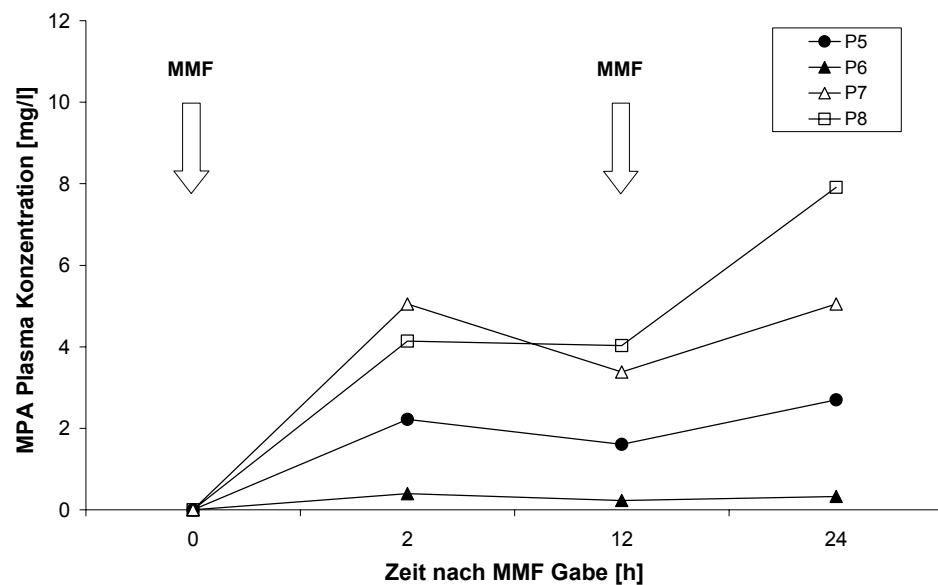


Abbildung 37: MPA Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 50 mg/kg CellCept-IV[®] BID. Tier P6 zeigte nur minimale Spiegel, während die anderen Tiere anscheinend eine gute Resorption aufwiesen. Die Plasmaspiegel zeigten jedoch eine höhere Variabilität als nach subkutaner Applikation.

E. Studie 301

1. Allgemeine Daten und perioperativer Verlauf

Die demographischen Daten sind in Tabelle 3 dargestellt. Bis auf einen Unterschied im Ausgangsgewicht waren beide Gruppen vergleichbar. Das höhere Körpergewicht der Kontrollgruppe hatte keine Auswirkung auf die Gefäßflächen der transplantierten Aorta ($19,2 \pm 1,5 \text{ mm}^2$ vs. $15,5 \pm 1,8 \text{ mm}^2$, $p = 0,2$) und der mittlere Gewichtsunterschied zwischen Spender und Empfänger ($1 \pm 0,4 \text{ kg}$ in der Kontrollgruppe und $0,9 \pm 0,4 \text{ kg}$ in der MMF Gruppe) war vergleichbar.

Tabelle 3: Demographie der Aortentransplantations-Studie. Die Tiere C1 und C4, C2 und C6, C3 und C5, Rx1 und Rx4, Rx2 und Rx6, sowie Rx3 und Rx5 dienten jeweils als Paare für die Transplantation.

Tier (Nr)	Gewicht (kg)	Blutgruppe	MLR (SI)	Ischämiezeit (min)	Op-Zeit (min)
Kontrolle					
C1	7,4	B	38,4	49	110
C2	7,9	AB	3,8	32	110
C3	8,8	B	3,6	40	108
C4	8,8	B	4,3	47	129
C5	7,3	B	2,8	55	118
C6	7,8	AB	5,3	56	102
MMF					
Rx1	7,4	A	3,8	117	162
Rx2	8,3	A	6,8	43	108
Rx3	6,2	A	5,9	37	110
Rx4	6,8	A	4,9	47	132
Rx5	5,8	A	11,5	70	125
Rx6	6,4	A	10,9	56	135
P (Kontrolle vs. MMF)	0,03	-	0,7	0,27	0,12

Bei den zwölf durchgeführten Transplantationen lagen die Ischämiezeiten im Mittel bei 54 Minuten (32 – 117 min) und die Operationszeiten bei 120 Minuten (102 – 162 min). Kein Tier verstarb an dem Eingriff.

Nur in einem Tier traten Komplikationen auf: Bei diesem Tier (Rx1) mußte aufgrund einer Dissoziation beider Iliacalarterien eine End-zu-End-Anastomose der Aorta mit der linken A. iliaca communis, sowie eine End-zu-Seit-Anastomose zwischen der rechten und linken A. iliaca communis durchgeführt werden (Abbildung 38). Dieses Tier erlitt am 8. postoperativen Tag aufgrund einer ileocoecalen Invagination einen Dünndarmileus. Es erfolgte eine Dünndarmsegmentresektion des invaginierten Darmabschnittes (Abbildung 39).

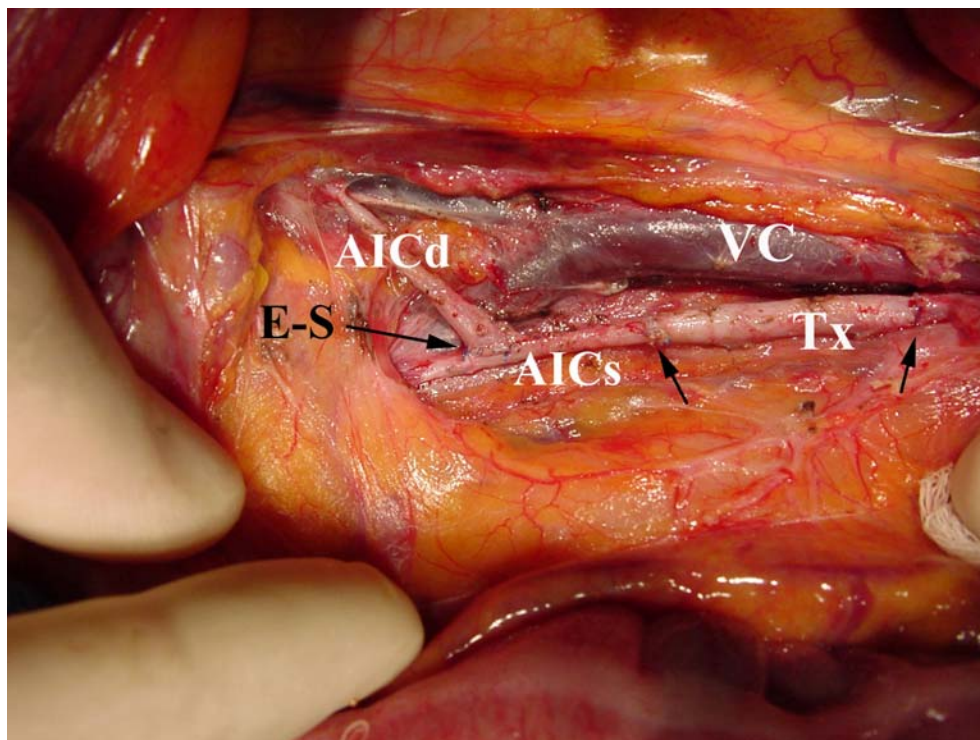


Abbildung 38: Tier Rx1: Rekonstruktion der Aortenbifurkation, nachdem die zunächst durchgeführte End-zu-End-Aorto-Aortostomie zu einer Dissoziation der Iliacalgefäße führte. Zur Vermeidung einer Abgangsstenose wurde eine End-zu-End-Anastomose zwischen Transplantat (Tx) und A. iliaca communis sinistra (AICs) durchgeführt und anschließend die rechte Iliacal-Arterie (AICd) End-zu-Seit (E-S) implantiert. Die Pfeile markieren die Anastomosen. VC: Vena cava.

Postoperativ erholte sich das Tier schnell und die Intima-Hyperplasie war am Tag 42 mit der Transplantat-Vaskulopathie der anderen Tieren vergleichbar. Das Tier wurde nicht von der Studie ausgeschlossen und entsprechend dem Protokoll begann die MMF Therapie an Tag 45.

Bei den insgesamt 60 operativen IVUS Eingriffen traten bei je einem Tier je Gruppe (3,3%) eine Dissektion der Aorta auf, die jedoch in beiden Fällen innerhalb von 3 Wochen folgenlos abheilte. Bei einem Eingriff in der Kontrollgruppe (3,3%) und bei 4 Eingriffen in der MMF Gruppe (13,3%; $p=0,16$) entwickelte sich während der IVUS-Untersuchung ein intraarterieller Thrombus, der mittels Fogarty Manöver entfernt werden mußte. Bei einem Tier mußte aufgrund eines ausgeprägten Vasospasmus an Tag 42 die IVUS Untersuchung vorzeitig beendet werden.

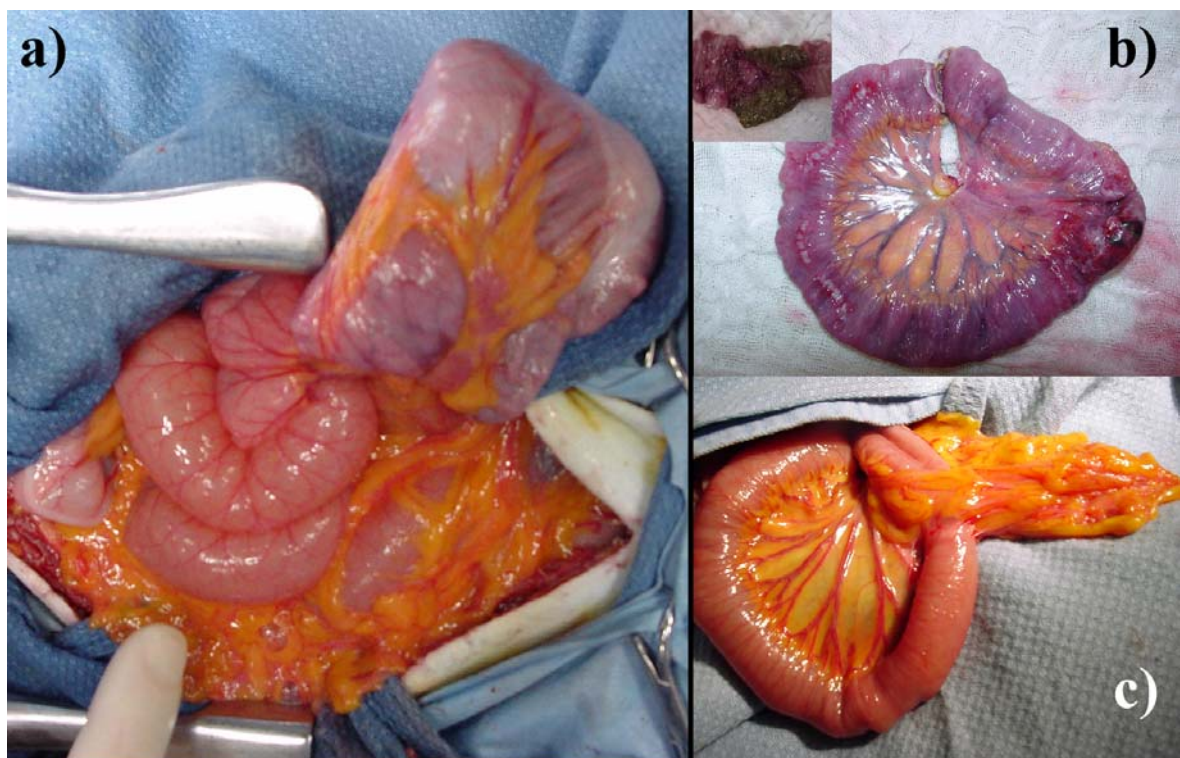


Abbildung 39: Dünndarm Invagination (Tier R×1). a) Operations situs: etwa 30 cm vor der Bauhin' Klappe war das terminale Ileum bis ins Colon ascendens invaginiert und hatte zu einem Darmverschluß mit Ischämie des terminalen Ileums geführt. Am Resektat (b) zeigte sich eine polypöse Raumforderung als Ursache (Inlay). c) Bei Versuchsende stellte sich die Anastomose reizlos, ohne Stenose und mit Omentum majus abgedeckt dar.

Nach keinem der 60 Eingriffe kam es zu einer arteriellen Ischämie des Beines. Insgesamt mußte kein Tier aufgrund einer Komplikation aus der Studie ausgeschlossen werden. Auch eine MMF Intolerabilität führte nicht zu einem vorzeitigen Studienabbruch.

2. MMF Therapie und ihre spezifischen Komplikationen

In der Behandlungsgruppe begannen alle Tiere am Tag 45 nach der Aortentransplantation mit der MMF Therapie. Diese startete mit der subkutanen Gabe von 50 mg/kg CellCept-IV® BID für 8 Tage. Aufgrund von Hautveränderungen bei 2 Tieren wurde ab Tag 9 die MMF Therapie bei allen Tieren auf die orale Gabe von 50 mg/kg MMF BID umgestellt. Ab dem 50. postoperativen Tag wurde die MMF Dosis entsprechend des Studienprotokolles für jedes Tier individuell festgesetzt (Abbildung 40).

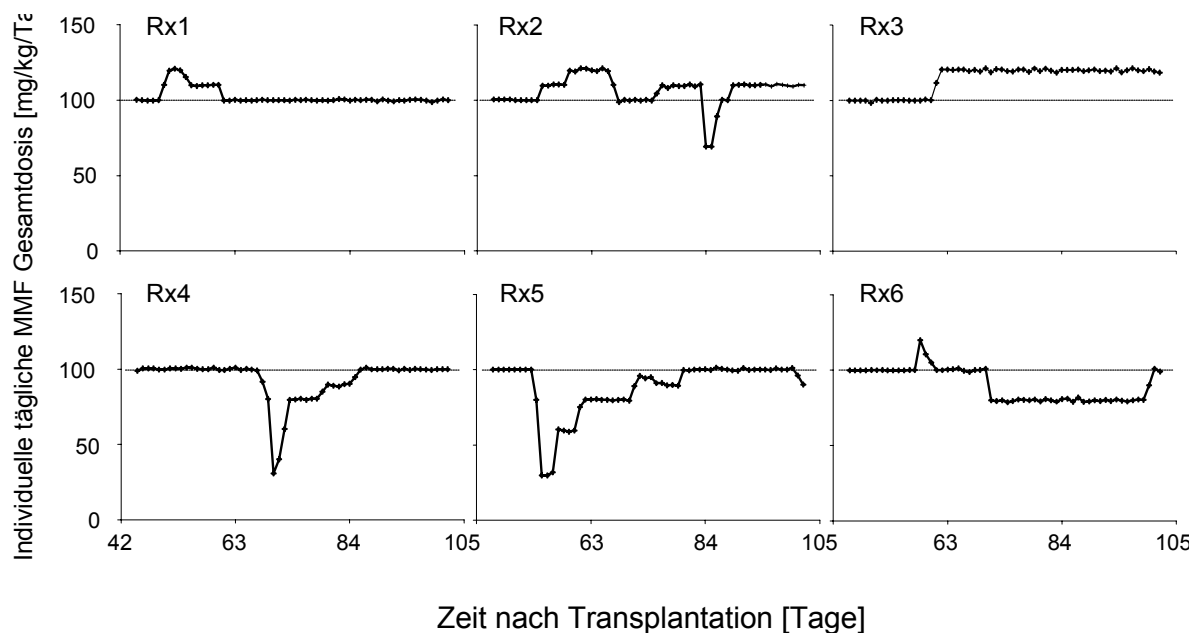


Abbildung 40: Individuelle tägliche MMF Gesamtdosis verabreicht in zwei Einzeldosen. Die Dosierung richtete sich nach Toxizität, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern.

Für die gesamte Behandlungsdauer von 58 Tagen wurde eine mittlere MMF Dosis von $99,2 \pm 4,2$ mg/kg/Tag erreicht. Aufgrund von Medikamenten Nebenwirkungen mußte bei 4 Tieren zeitweilig die Dosis unter die Startdosis von 100 mg/kg/Tag gesenkt werden (Rx2 – 3 Tage, 5% der Behandlungstage; Rx4 – 18 Tage, 31% der Behandlungstage; Rx5 – 29 Tage, 50% der Behandlungstage; Rx6 – 30 Tage, 52% der Behandlungstage). Bei keinem Tier mußte MMF komplett abgesetzt werden, aber bei 2 Tieren wurde die Dosis zeitweilig auf unter 50 mg/kg/Tag reduziert.

Wie auch in Studie 201 war der Gewichtsverlust die bedeutendste Nebenwirkung von MMF. Bis zum Tag 42 waren die Gewichtsveränderungen in Kontroll- und Therapiegruppe gleich. Alle Tiere nahmen nach kurzfristigem Gewichtsverlust in Folge der Transplantation ($p = 0,01$ im Vergleich zum präoperativen Gewicht) wieder an Gewicht zu. Während sich diese Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe fortsetzte, nahmen die Tiere in der MMF Gruppe nach Therapiebeginn wieder Gewicht ab und von Tag 63 an war der Unterschied

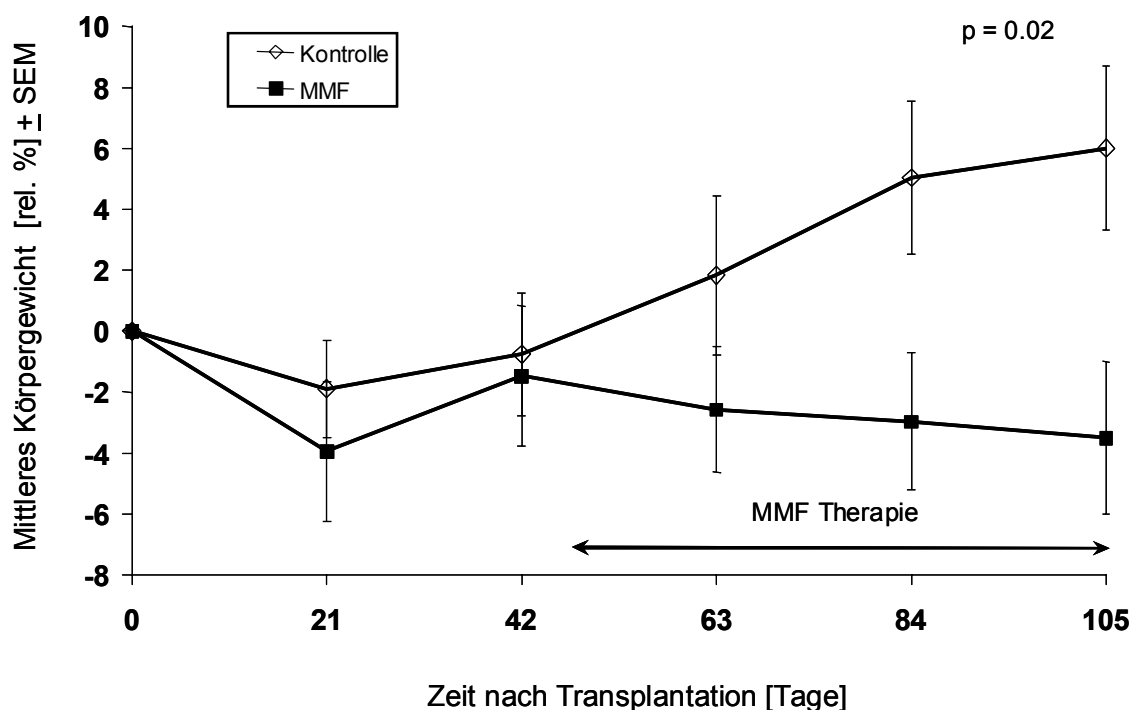


Abbildung 41: Gewichtsverlauf nach Aortentransplantation. Nach initialer Gewichtszunahme nach Tx nahmen die Tiere in der Therapiegruppe nach Beginn der MMF Therapie wieder an Gewicht ab.

zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p = 0,02$). Hierbei war die individuelle Sensitivität der Tiere auf MMF sehr unterschiedlich und der maximale Gewichtsverlust variierte zwischen 2,5% und 14,2%.

Während der gesamten Studiendauer zeigten alle Tiere zu jederzeit ein unauffälliges Verhalten, das täglich als wach, aufmerksam und empfänglich eingestuft wurde. Während der Therapiedauer war der Appetit bei 4 Tieren für die Dauer von ein bis 37 Tagen reduziert. Die maximale Dauer des Appetitverlustes war ein bis acht Tage in Folge. Durchfälle traten bei 4 Tieren in einer Dauer von 6 bis 12 Tage auf. Die Zusammenfassung der Nebenwirkungen der MMF Therapie ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Andere Nebenwirkungen fielen während der Studie nicht auf oder sind bei der Autopsie nicht diagnostiziert worden. Die Veränderungen im Blutbild und in der Blutchemie sind in Tabelle 5 aufgezeigt. Knochenmarkstoxizität trat nicht auf. Lediglich die Erythrozytenzahl

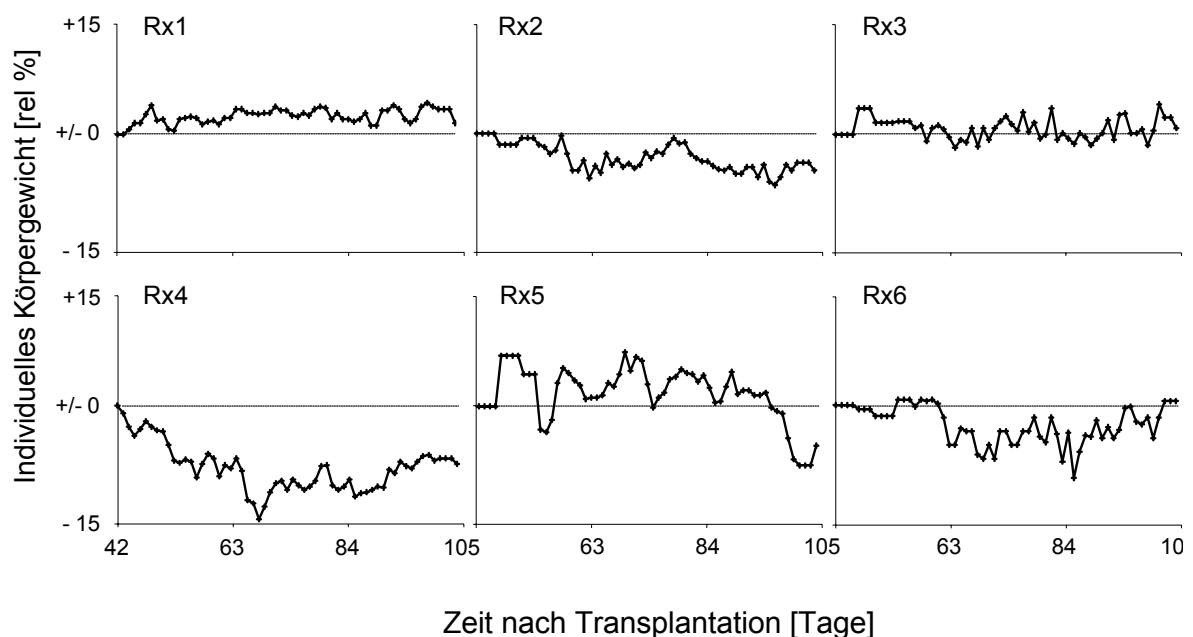


Abbildung 42: Individueller Gewichtsverlauf in der Therapiegruppe. Die Tiere zeigten eine sehr unterschiedliche Sensitivität für die MMF Toxizität

fiel von $6,1 \pm 0,2$ /nl auf $5,2 \pm 0,4$ /nl signifikant ($p = 0,03$), aber klinisch nicht bedeutsam ab. Es zeigten sich keine Zeichen einer Leber-, Nieren-, oder Pankreasfunktionsstörung. Erniedrigte Gesamt-Eiweißwerte an Tag 105 ($6,9 \pm 0,2$ mg/dl vs. $6,3 \pm 0,2$ mg/dl; $p = 0,01$) und der Abfall des Serum-Cholesterins von Tag 42 zu Tag 105 in der MMF Gruppe (94 ± 4 vs. 75 ± 8 ; $p = 0,05$) wurde als diskrete Zeichen einer Mangelernährung gewertet.

Tabelle 4: Nebenwirkung der MMF Therapie für jedes Tier individuell aufgeführt: Dargestellt ist die Anzahl der Tage, an denen die unerwünschte Wirkung auftrat bzw. mittels Gavage zugefüttert wurde.

Tier	Depressives Verhalten [Tage]	Appetitverlust [Tage]	Diarrhoe [Tage]	Erbrechen [Tage]	Zufütterung [Tage]
Rx1	-	37	9	2	47
Rx2	-	10	-	2	37
Rx3	-	-	-	1	-
Rx4	-	14	7	-	37
Rx5	-	-	6	1	-
Rx6	-	1	12	5	-

Tabelle 5: Blutbild und Laborchemie in Kontroll- und MMF-Gruppe Tag 42 und 105.

	Kontrolle		p (42-105)	MMF		p (42-105)	p (Kontrolle vs. MMF)	
	Tag 42	Tag 105		Tag 42	Tag 105		Tag 42	Tag 105
Hämoglobin (mg/dl)	13,2±0,3	12,8±0,3	0,5	12,6±0,3	11,1±0,8	0,1	0,3	0,1
Hämatokrit (%)	41±0,8	40,5±1,1	0,4	39,9±0,9	35,5±0,8	0,3	0,1	0,1
Erythrozyten (10 ³ /nl) ^c	6,5±0,1	6,3±0,2	0,2	6,1±0,2	5,2±0,4	0,05	0,07	0,03
Leukozyten (/nl) ^c	9,2±1,3	8,2±0,6	0,7	11,2±,9	7,5±1,4	0,1	0,3	0,7
Thrombozyten (/nl)	356±33	331±23	0,5	399±30	306±33	0,1	0,3	0,6
Ges. Eiweiß (mg/dl)	7,1±0,1	6,9±0,1	0,2	6,8±0,2	6,3±0,2	0,1	0,2	0,01
Albumin (mg/dl)	3,9±0,1	3,9±0,2	0,9	3,9±0,1	3,8±0,2	0,3	0,5	0,3
Amylase (IU/l)	303±31	278±33	0,2	340±50	261±20	0,4	0,8	1,0
Lipase (IU/l)	10,8±1,6	15±2,9	0,2	9,4±1,9	6,7±1,5	0,05	0,6	0,02
Kreatinin (mg/dl)	1,2±0,1	1,1±0,05	0,3	0,9±0,05	0,8±0,1	0,3	0,08	0,09
Harnstoff (mg/dl) ^c	13,5±1,8	11,5±0,5	0,7	10,2±0,8	9±1,6	0,8	0,2	0,5
Ges. Bilirubin (mg/dl)	0,2±0,05	0,18±0,02	0,8	0,2±0,05	0,13±0,02	0,02	0,8	0,09
Konj.. Bilirubin (mg/dl)	0,05±0,02	0,03±0,01	0,5	0,04±0,001	0,03±0,01	0,01	1,0	0,3
AST (IU/l)	40±3	35±2	0,3	34±3	24±1	0,04	0,3	0,01
ALT (IU/l)	19±5	33±16	0,6	24±3	18±3	0,3	0,3	0,8
AP (IU/l)	164±17	141±14	0,5	229±19	192±15	0,3	0,04	0,06
Cholesterol (mg/dl)	98±6	92±8	0,8	94±4	75±8	0,05	0,7	0,2
Triglyzeride (mg/dl)	49±6	74±12	0,06	55±5	50±8	0,5	0,4	0,1
Glukose (mg/dl)	42,1±5,3	55,8±7,1	0,13	45,3±4,3	53,3±4,3	0,4	0,5	0,7
LDH (IU/l) ^c	508±96	413±71	0,5	460±83	273±30	0,1	0,7	0,2
CPK (IU/l)	356±80	233±71	0,2	488±205	285±147	0,18	0,6	0,8

3. Pharmakokinetische Untersuchungen

Nach der ersten MMF Dosis an Tag 45 nach Aortentransplantation wurden mittlere MPA Talspiegel von 2,3 mg/l (1,8 – 2,8 mg/l) erreicht. Auch nach der Umstellung auf die orale Applikation zeigten erste Talspiegel suffiziente MPA Werte (Mittel: 4,7 mg/l; 2,4 – 7,9 mg/l). Während der gesamten Versuchsdauer bis zur letzten MMF Dosis an Tag 103 variierten die MPA Plasma – Talspiegel zwischen 1,38 und 11,4 mg/l. Insgesamt wurde aber nur bei drei Tieren jeweils an einem einzelnen Tag ein MPA Talspiegel von unter 2 mg/l gemessen, was eine individuelle Dosiserhöhung zur Folge hatte.

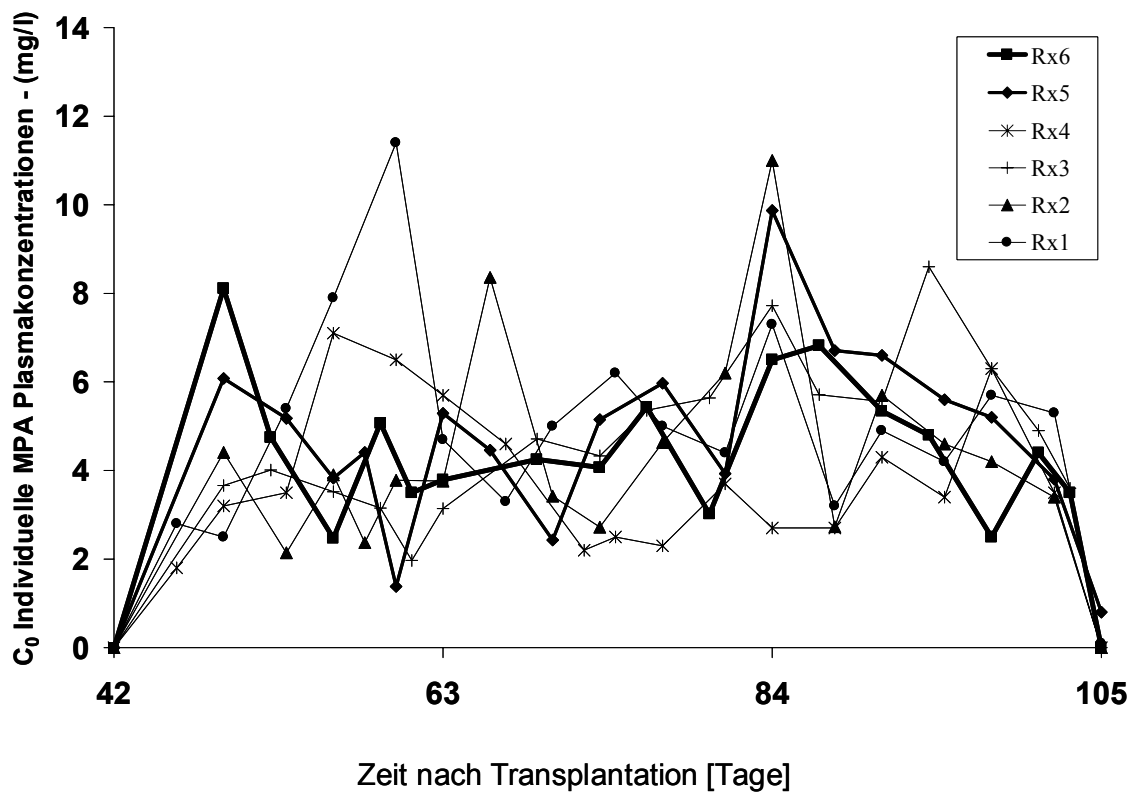


Abbildung 43: Individuelle MPA Plasma Talspiegel nach MMF Therapie zwischen Tag 45 und 103 nach Aortentransplantation

4. Pharmakodynamische Untersuchungen

a) *In vitro*

Pharmakodynamische Untersuchungen wurden an Tag 42, vor Beginn der MMF Therapie, durchgeführt um einen Referenzwert für die weiteren Messungen der Studie zu erhalten. Hierbei wurde auch eine *in vitro* Versuchsreihe mit einbezogen, um inter-individuelle Unterschiede in der MPA Sensitivität der verschiedenen Tiere zu testen.

Die berechnete IC_{50} der Lymphozyten Proliferation, analysiert anhand der PCNA – Expression in SG_2M^+ Zellen, lag bei allen Tieren bei 0,48 mg/l (0,3 – 0,61 mg/l) und I_{max} bei $91,86 \pm 4,5$ rel% PCNA Inhibition. Die Korrelation (r^2) zwischen MPA Konzentration und Inhibition der Lymphozyten Proliferation lag bei 0,95.

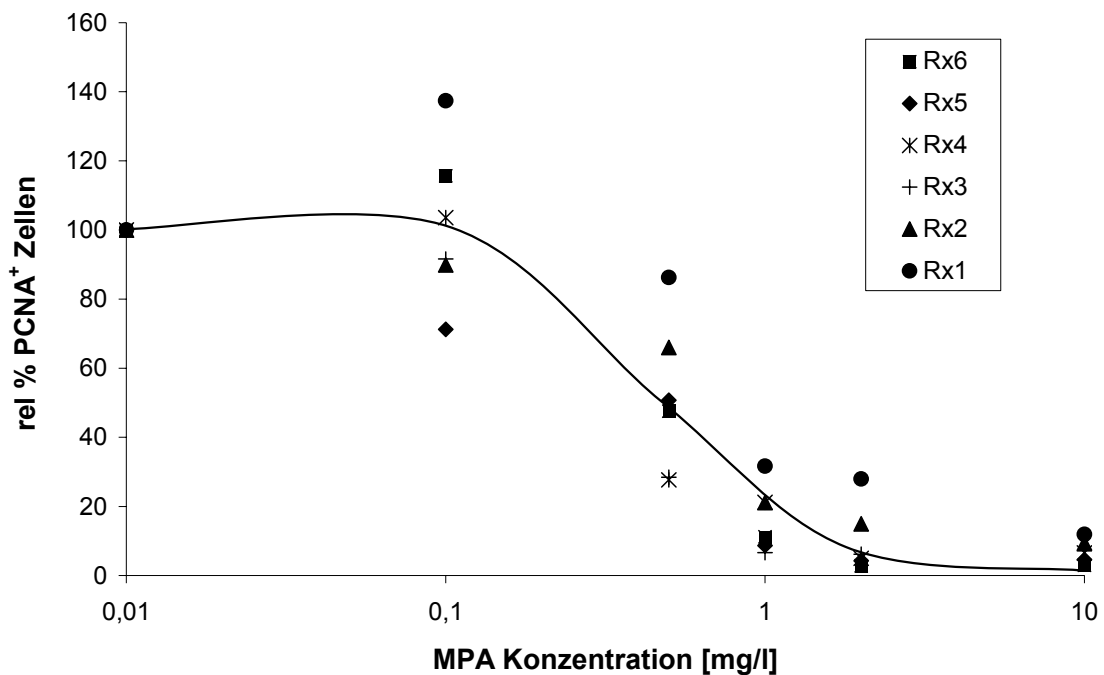


Abbildung 44: Korrelation zwischen *in vitro* MPA Konzentration und PCNA Expressionshemmung in SG_2M Zellen (IC_{50} : 0,48 mg/l (0,3 – 0,61 mg/l; I_{max} : $91,86 \pm 4,5$ rel%; $r^2=0,95$), gemessen an den 6 Tieren der Behandlungsgruppe vor Beginn der MMF Therapie an Tag 42 nach Transplantation.

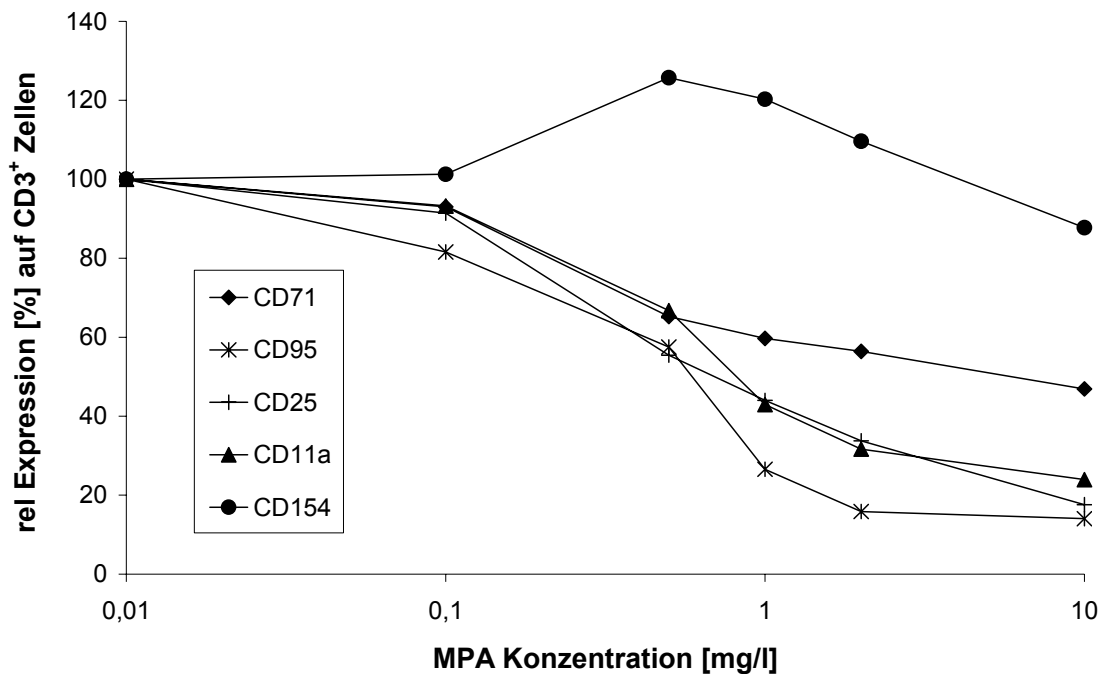


Abbildung 45: In vitro Einfluss von MPA auf Zelloberflächen-Antigene auf CD3⁺ Zellen in 6 Cynomolgus Affen (Rx1-Rx6) vor Beginn mit der MMF Therapie. Zur Erhaltung der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken verzichtet; Einzelheiten im Text.

Über die gesamte MPA Konzentrationsreihe war nach mitogener Stimulation die Expression der Subset Marker CD3, CD14 und CD20 konstant. Konzentrationsabhängig, aber in verschiedenem Ausmaß, wurden die Oberflächenantigen-Expression von CD71 (IC_{50} : $0,33 \pm 0,1$ mg/l, I_{max} : $51,4 \pm 3,2$ rel%; r^2 : 0,94), CD95 (IC_{50} : $0,42 \pm 0,07$ mg/l, I_{max} : $91,4 \pm 5,6$ rel%; r^2 : 0,94), CD25 (IC_{50} : $0,51 \pm 0,1$ mg/l, I_{max} : $83,7 \pm 5,8$ rel%; r^2 : 0,95), CD11a (IC_{50} : $0,56 \pm 0,1$ mg/l, I_{max} : $77,3 \pm 6,2$ rel%; r^2 : 0,9), und CD154 (IC_{50} : > 10 mg/l, I_{max} : $> 25,3$ rel%; r^2 : 0,38) auf CD3⁺ Zellen gehemmt (Abbildung 45). MPA hatte keinen Einfluss auf die intrazelluläre Zytokin-Expression (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ) in CD3⁺ Zellen (Abbildung 46), sowie auf die B Zell- und Monozyten-Funktion (Abbildung 47).

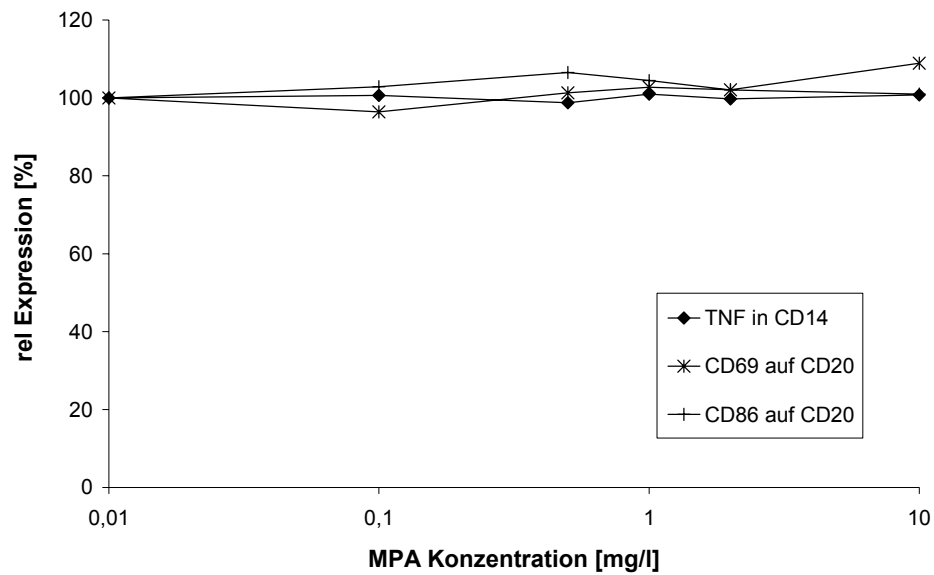


Abbildung 46: Intrazelluläre Expression von IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ in CD3⁺ Zellen. MPA hat keinen Einfluss auf die Zytokin - Expression in vitro

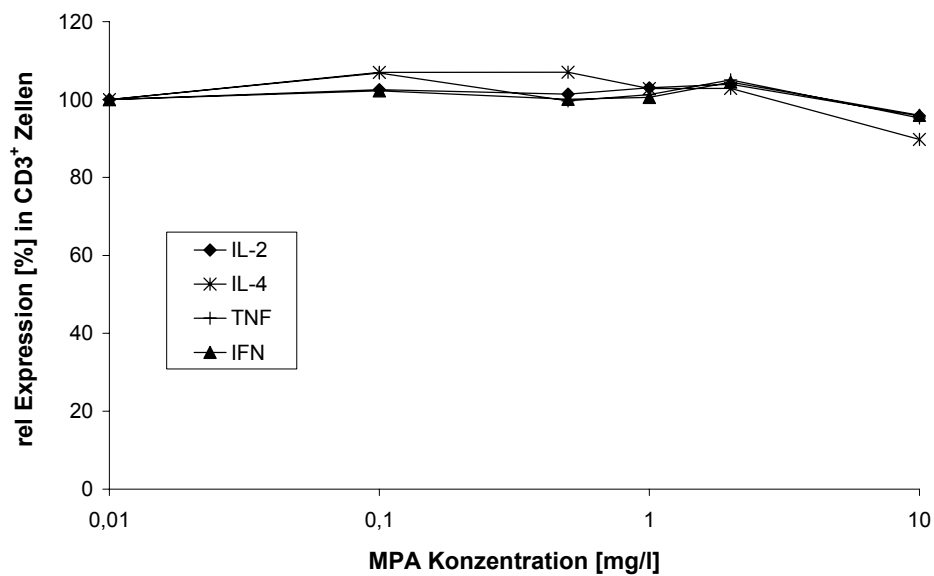


Abbildung 47: Einfluss von MPA auf die Monozyten- und B Zellfunktion in vitro. Die intrazelluläre TNF- α Expression in CD14⁺ Zellen und die CD69 bzw. CD86 Expression in CD20⁺ Zellen bleibt auch bei steigender MPA Konzentration konstant.

b) *In vivo*

Parallel zu jeder Bestimmung der MPA-Plasma-Talspiegel wurde die Hemmung der Lymphozytenproliferation, sowie die Expression von CD25 und CD71 auf T Zellen gemessen.

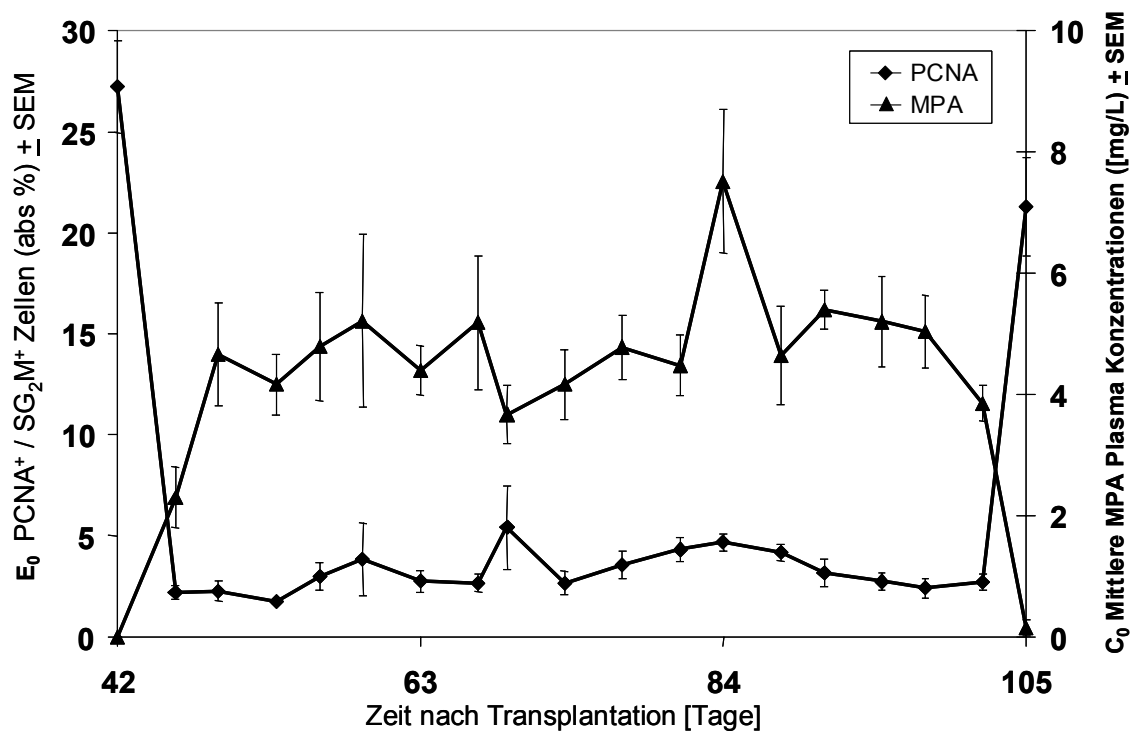


Abbildung 48: Vergleich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MMF. Die MPA Plasma Talspiegel zeigten eine höhere Streuung als die korrespondierenden Lymphozyten-Proliferationsraten.

Die Varianz der Messung der Proliferationsrate war deutlich niedriger als die der MPA-Plasmaspiegel (Abbildung 48). Ziel während der Behandlung mit MMF war es, absolute Proliferationsraten von weniger als 5% zu erzielen. Bei höheren Werten wurde eine MMF Dosisanpassung angestrebt. Nach der ersten subkutanen MMF Gabe wurden PCNA-Expressionen von 1,85 bis 2,5 abs% erzielt (Abbildung 49). Nach Umstellung auf die orale MMF Applikation stiegen die PCNA-Expressionsraten im Mittel auf 4,0 abs% an (1,98 – 9,03 abs%). Insgesamt wurden bei 5 von 6 Tieren an 2 bis 6 Therapietagen Proliferationsraten von mehr als 5 abs% gemessen.

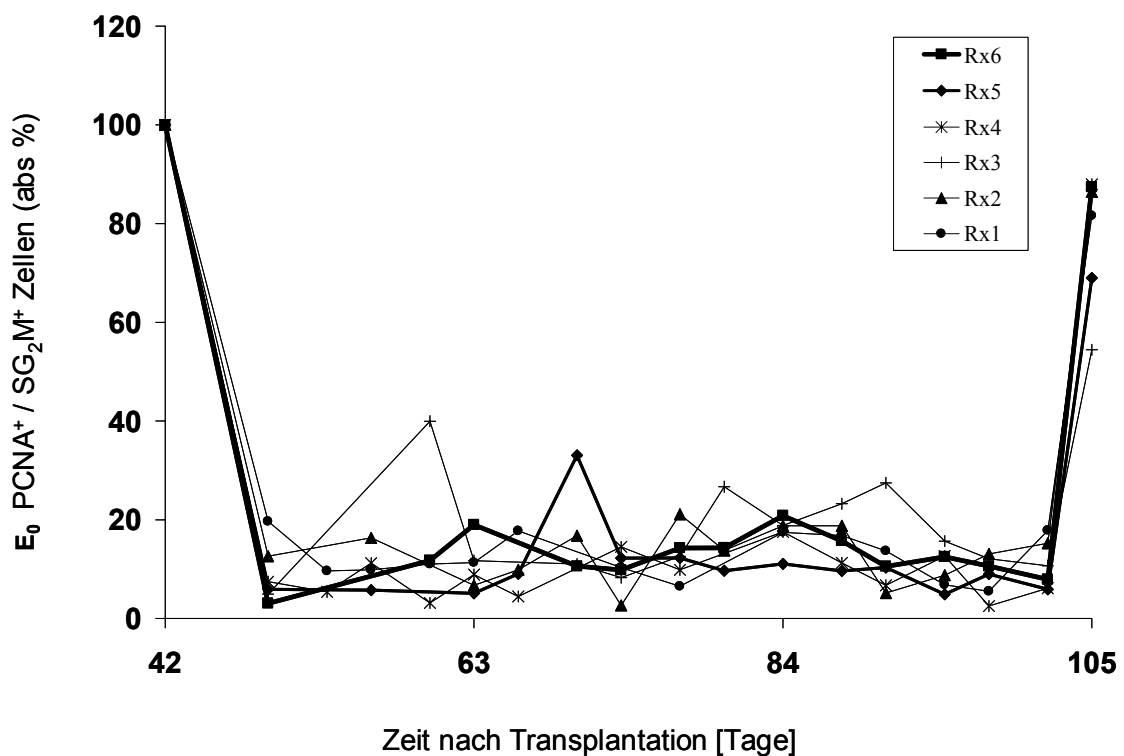


Abbildung 49: Individuelle Bestimmung der Lymphozytenproliferation jeweils zum Zeitpunkt vor der nächsten MMF Gabe. Schon nach der initialen MMF Gabe wurde die PCNA Expression gehemmt und zeigte im Vergleich zu den MPA Plasmaspiegeln nur eine mäßige Variation. Am Tag 105, zwei Tage nach der letzten MMF Gabe, hatten sich die Werte noch nicht vollständig normalisiert.

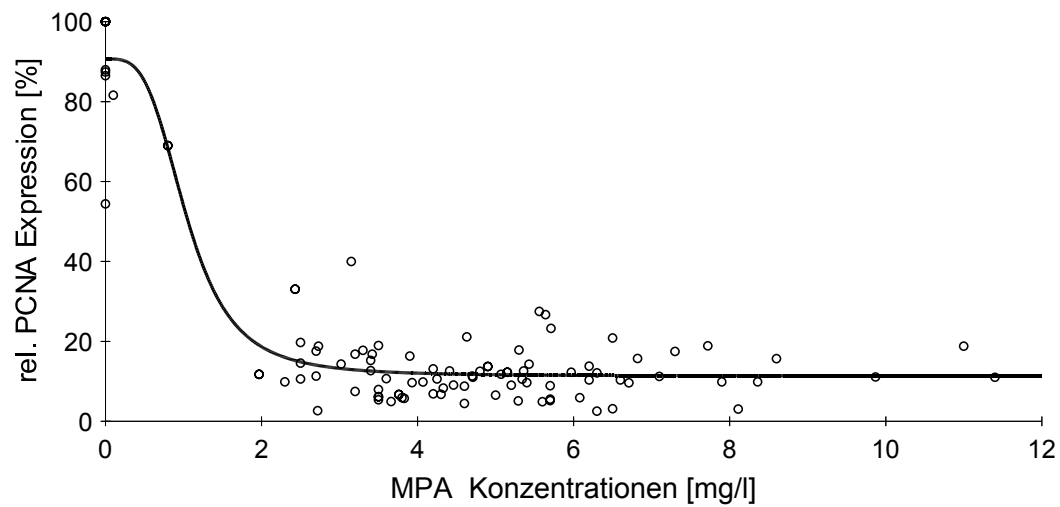


Abbildung 50: Pharmakodynamisch – pharmakokinetische Beziehung *in vivo* zwischen der PCNA/SG2M Expression und den MPA Plasmaspiegeln in *Cynomolgus* Affen nach Aortentransplantation. Die geringe Anzahl von MPA – Konzentrationen von weniger als 2 mg/l verhinderten eine valide Bestimmung des IC_{50} .

Tabelle 6: Individuelle Unterschiede im PK/PD Zusammenhang *in vivo* nach Aortentransplantation; E_{min} bezeichnet die berechnete, niedrigste mögliche PCNA Expression bei $MPA = \infty$.

Tier	E_{min} [rel%]	r^2
Rx1	6,8	0,97
Rx2	12,8	0,94
Rx3	7,7	0,83
Rx4	4,7	0,99
Rx5	10,5	0,96
Rx6	4,7	0,95

Die retrospektiv, nach Abschluß der Studie kalkulierte maximale Inhibition wurde mit $88,7 \pm 1,3$ rel% bestimmt. Die inter-individuellen Unterschiede zwischen den Tieren war hierbei jedoch hoch:

In vivo lag die Korrelation zwischen der CD71 Expression auf T Lymphozyten nur bei $r^2 = 0,59$ bei einer I_{\max} von $52,9 \pm 3,7\%$. Während die CD71 Expression in den ersten drei Wochen der Behandlung bei allen Tieren inhibiert war (Tag 53: $27,3 \pm 9,6$ rel%), stieg sie im weiteren Verlauf trotz gleichbleibender MPA-Spiegel wieder an (Tag 84: $53,6 \pm 8,8$ rel%). Ähnlich verhielt sich die Expression von CD25 auf T-Lymphozyten ($r^2: 0,84$; I_{\max} : $75,4 \pm 3,1$ rel%).

In vivo wurde die IC_{50} für Proliferation, CD71 und CD25 Expression aufgrund der geringen Anzahl von MPA Plasmaspiegel von unter 2,0 mg/l nicht bestimmt (siehe Abbildung 50

5. IVUS – Morphometrie

a) Gefäßvolumina

In der Kontrollgruppe lag am Tag 21 das Gefäßvolumen des mittleren Aortentransplantatdrittels bei $192,68 \pm 15,95 \text{ mm}^3$ und nahm bis zum Tag 105 ($160,03 \pm 16,79 \text{ mm}^3$) signifikant ab ($p = 0,02$). In der Therapiegruppe waren die Gefäßvolumina an Tag 21 ($154,62 \pm 18,35 \text{ mm}^3$) und Tag 42 ($165,87 \pm 15,12 \text{ mm}^3$) vergleichbar ($p = 0,47$) und veränderte sich bis zum Tag 105 ($137,87 \pm 12,84 \text{ mm}^3$) nicht signifikant ($p = 0,17$). Der Unterschied zwischen den Gruppen war zu keiner Zeit signifikant ($p = 0,32$ an Tag 105).

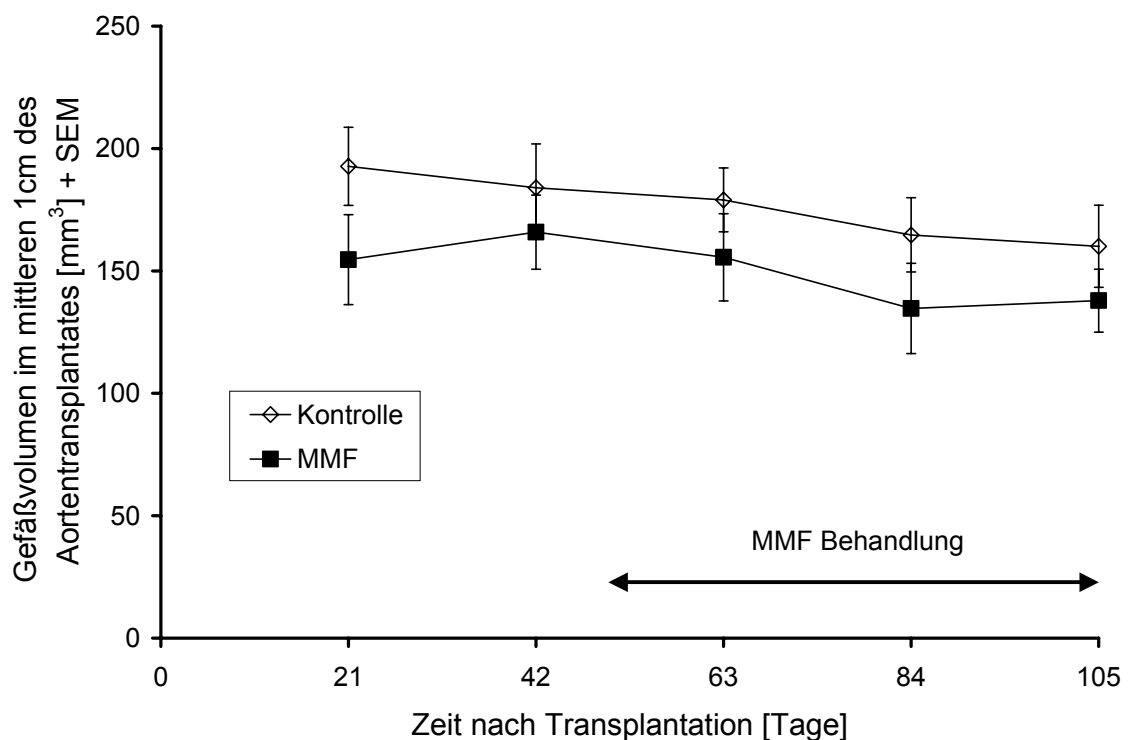


Abbildung 51: Mittleres Gefäßvolumen \pm SEM im Aortentransplantat. Nur in der Kontrollgruppe und nicht in der Therapiegruppe fiel das Gefäßvolumen von Tag 21 zu Tag 105 signifikant ab ($p = 0,02$). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Der minimale Gefäßquerschnitt änderte sich in der Kontrollgruppe von $17,9 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ an Tag 21 auf $14,57 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ an Tag 105 ($p < 0,04$) und in der MMF Gruppe von $14,1 \pm 2,1 \text{ mm}^2$ auf $12,5 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ($p = 0,3$) (Abbildung 51 und Abbildung 52).

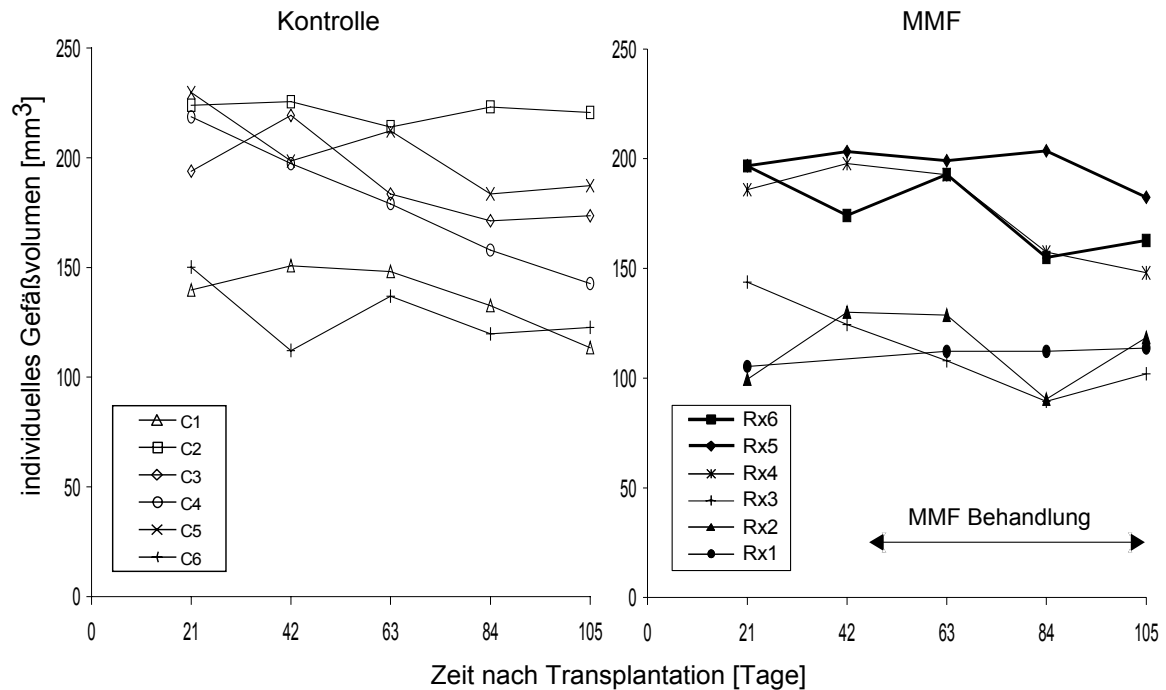


Abbildung 52: Individuelle Entwicklung der Gefäßvolumina von Tag 21 bis Tag 105 in Kontroll- und MMF-Gruppe.

b) Lumen volumina

In der Kontrollgruppe verringerte sich die Lumenfläche in der Aorta im mittleren Drittel des Transplantates hoch signifikant von Tag 21 ($16,7 \pm 4,0 \text{ mm}^2$) auf $10,4 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ an Tag 105 ($p < 0,001$). In der MMF Therapiegruppe kam es ebenfalls zu einem Abfall des Lumens von $13,4 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ auf $8,9 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ ($p < 0,01$) und der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,3$) (Abbildung 53 und Abbildung 54).

Die Reduktion des Gefäßlumens hatte in keiner Gruppe einen Einfluss auf den gemessenen Blutdruckgradienten über das Aorteninterponat: Bei einem Mitteldruck von 71 ± 2 mmHg in der proximalen Aorta war ein Blutdruckgradient zwischen proximal und distal des Transplantates in der Kontrollgruppe von $5,3 \pm 1,6$ mmHg und in der MMF Gruppe von $3,3 \pm 1,6$ mmHg zu messen ($p = 0,3$).

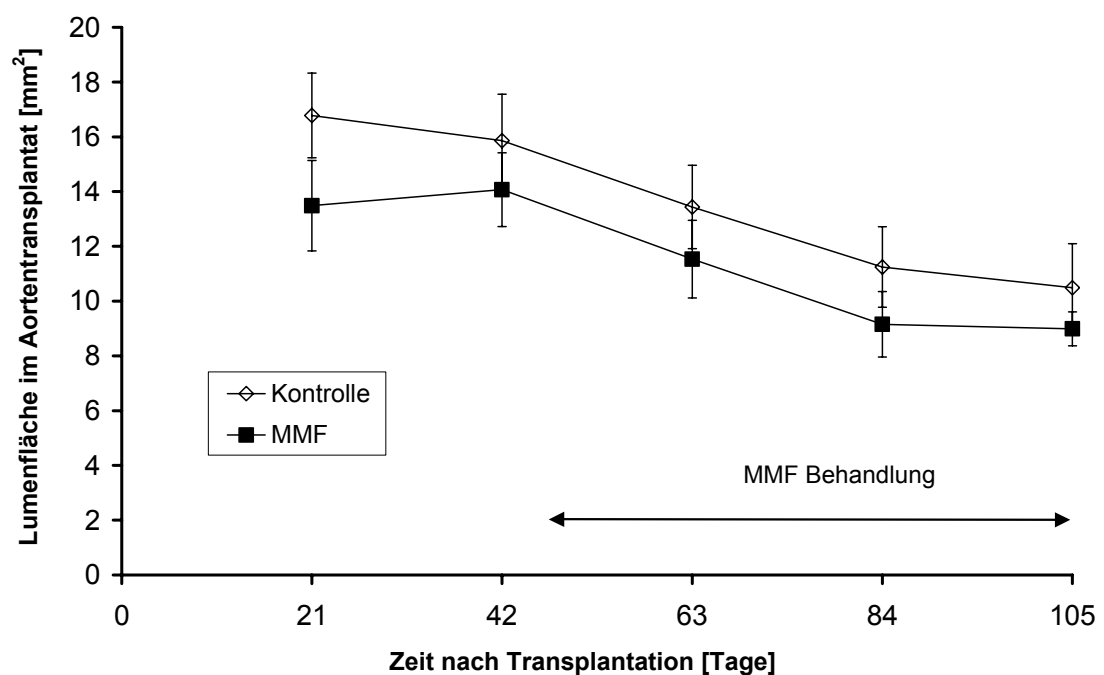


Abbildung 53: Mittlere Lumenfläche im Aortentransplantat. Um Einflüsse der Anastomose zu vermeiden bezog sich die Messung auf das mittlere 1cm-Segment. In beiden Gruppen nahmen die Lumina signifikant ab.

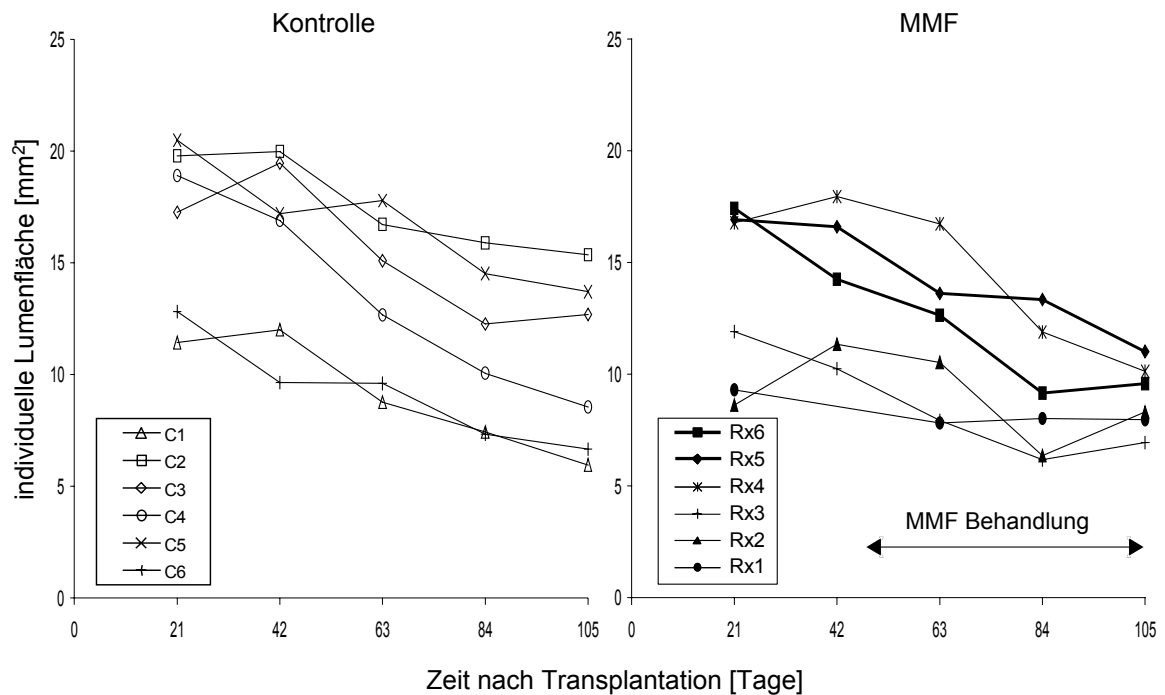


Abbildung 54: Individuelle Entwicklung der Gefäßflächen in der IVUS Untersuchung

c) Intimavolumina

Bei der ersten IVUS Messung an Tag 21 nach Transplantation zeigte die Intima im mittleren Drittel der transplantierten Aorta ein Volumen von $24,9 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe und von $19,7 \pm 2,5 \text{ mm}^3$ in der Behandlungsgruppe ($p = 0,1$). An Tag 42, drei Tage vor Therapiebeginn, glichen sich die Volumina noch weiter an (Kontrolle: $25,4 \pm 2,1 \text{ mm}^3$; MMF: $25,1 \pm 3,6 \text{ mm}^3$; $p = 0,9$). Ausgehend von diesen Werten nahm das mittlere Intimavolumen bis zum Tag 105 in der Kontrollgruppe signifikant ($p = 0,028$) auf $55,2 \pm 2,8 \text{ mm}^3$ zu. In der MMF Behandlungsgruppe kam es zu einem geringeren, aber auch statistisch signifikanten ($p = 0,043$) Anstieg auf $47,8 \pm 7,2 \text{ mm}^3$. Der Unterschied zwischen den Gruppen war an Tag 105 nicht signifikant ($p = 0,37$) und auch im GLM Modell für wiederholte Messungen war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen ($p = 0,3$) (Abbildung 55)

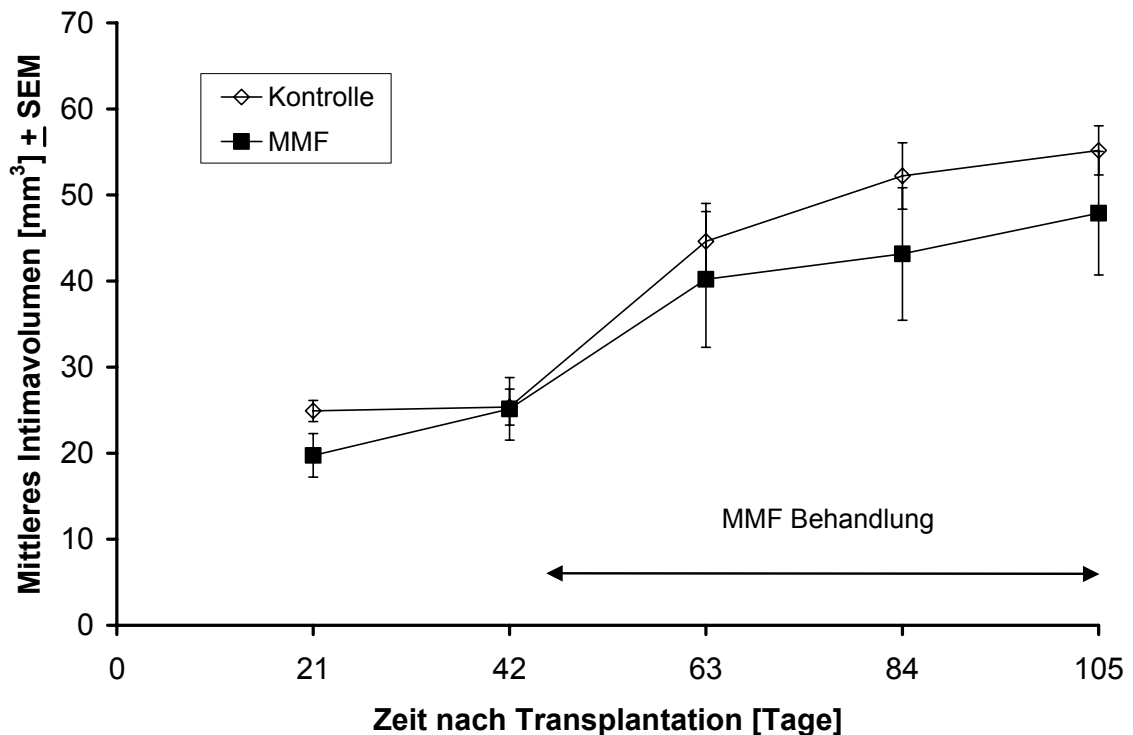


Abbildung 55: Entwicklung der mittleren Intimahyperplasie, dargestellt anhand der IVUS Messung des Intimavolumens [mm³], an den Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 nach Aortentransplantation. Die Messungen fanden im mittleren, 1 cm langen Segment des Transplantates statt, um nicht dem Einfluss der Anastomosen zu unterliegen. In der allgemeinen Auswertung mit dem GLM Modell wiederholter Messungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,3$).

In der Analyse der einzelnen Tiere sah man, dass die Varianz in der Therapiegruppe deutlich höher war als in der Kontrollgruppe (Abbildung 56): Die Intimahyperplasie nahm bei allen Tieren in der Kontrollgruppe homogen zu. In der MMF Gruppe kam es dagegen bei vier Tieren (Rx1 – Rx4) zu einer Verlangsamung des Intimawachstums. Nach 105 Tagen war bei diesen Tieren die Intimahyperplasie niedriger als bei jedem Tier der Kontrollgruppe und der Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,02$). Bei den anderen zwei Tieren (Rx5, Rx6; fett gedruckt in Abbildungen) schritt die Intimahyperplasie ungebrems fort und es zeigte sich kein Unterschied zu den Kontrolltieren.

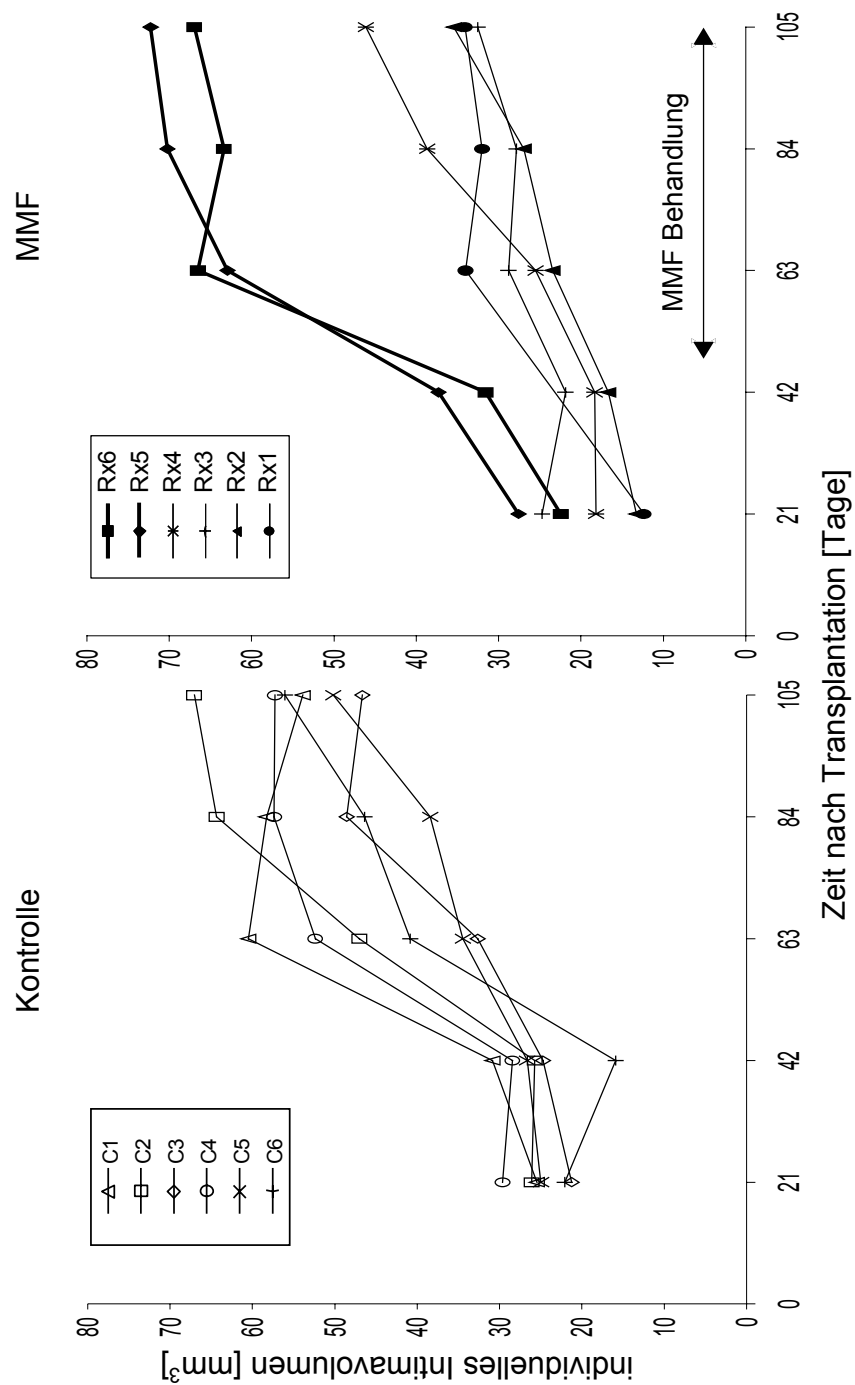


Abbildung 56: Entwicklung der mittleren Intimahyperplasie, dargestellt anhand der IVUS Messung des Intimavolumens [mm³], an den Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 nach Aortentransplantation. Die Messungen fanden im mittleren, 1 cm langen Segment des Transplantates statt, um nicht dem Einfluss der Anastomosen zu unterliegen. In der allgemeinen Auswertung mit dem GLM Modell wiederholter Messungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,3$).

6. *Histologische Untersuchungen*

a) *Qualitative Auswertung*

Ohne immunsuppressive Therapie in der Kontrollgruppe zeigten alle Aortentransplantate nach 105 Tagen ausgeprägte Veränderungen, die im histologischen Bild von der klinischen Transplantat-Vaskulopathie nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 57). Die TVP bestand aus einer Infiltration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten, die zu einer konzentrischen Intimahyperplasie führte. Ferner waren Makrophagen und Lymphozyten in die kollagenöse Matrix der Intima eingelagert. In der α -Actin Färbung zeigte sich, dass die Intimahyperplasie vor allem aus glatten Muskelzellen bestand. Die Membrana elastica interna war teilweise durchbrochen, teilweise erhalten und dupliziert. Die Mediaschichten waren mit fibrinösem Bindegewebe durchsetzt, das sich auch in das periadventitielle Gewebe ausbreitete. Die perivaskuläre Entzündung war nur gering, Cholesteroleinlagerungen oder Kalzifikationen waren nicht erkennbar. Die semiquantitative Beurteilung zeigte eine geringgradige TVP in einem Tier, eine mittelgradige in zwei und eine ausgeprägte TVP in drei Tieren.

Bei den MMF behandelten Tieren (Abbildung 58) war die Ausprägung der TVP geringgradig in zwei Tieren, mittelgradig in drei und ausgeprägt bei einem Tier. Auch hier entwickelte sich die Intimahyperplasie vor allem konzentrisch und die Veränderungen an der Membrana elastica interna, der Media und im periadventitiellen Bindegewebe entsprachen im wesentlichen denen der Kontrollgruppe.

Tabelle 7: Semiquantitatives Grading der histologischen Veränderungen nach Aortentransplantation. Grad 0: kein Anhalt für TVP; Grad I: minimale Intimaverdickung; Grad II: geringgradige Veränderungen; Grad III: mittelgradige Veränderungen; Grad IV: schwere Veränderungen der TVP.

Tier	TVP Grade	M. elastica interna	Konzentrisch/ Exzentrisches Wachstum	Kalzifikation/ Cholesterol	Perivaskuläre Entzündung
Kontrolle					
C1	IV	intakt	konzentr.	-/-	bandförmig
C2	II	frakt/redupl	konzentr.	-/-	wenig
C3	III	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
C4	IV	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
C5	IV	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
C6	III	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
MMF					
Rx1	III	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
Rx2	III	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
Rx3	II	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
Rx4	II	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal
Rx5	IV	frakt/redupl	konzentr.	-/-	wenig
RX6	III	frakt/redupl	konzentr.	-/-	multifokal

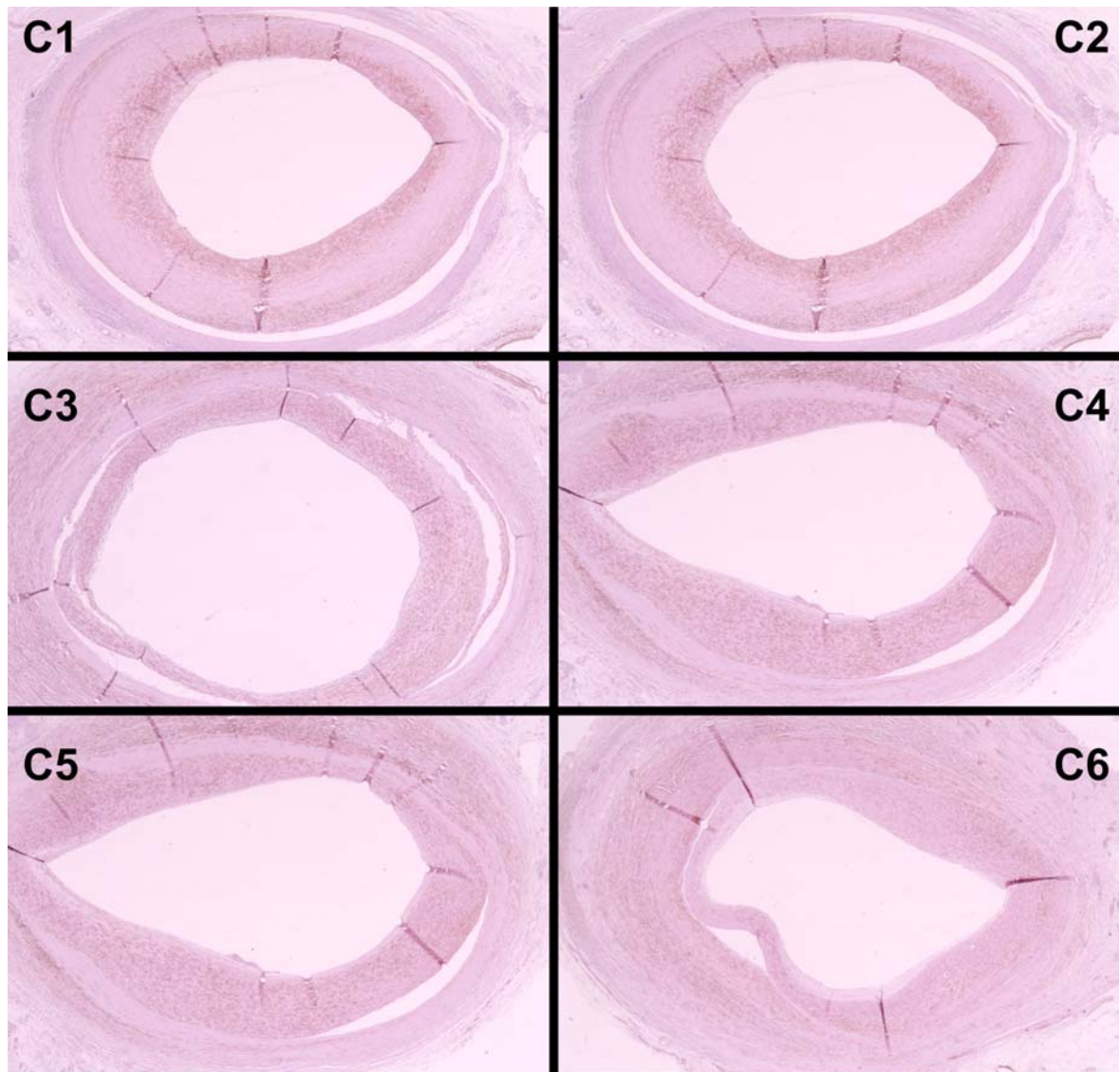


Abbildung 57: Intimahyperplasie in der Kontrollgruppe an Tag 105 nach Aortentransplantation. Ohne jegliche Immunsuppression entwickelte sich eine signifikante Verdickung der Intima, die im histologischen Bild der Transplantat-Vaskulopathie im Menschen entspricht. α -Actin-Färbung ($\times 20 - \times 30$) zur Darstellung der glatten Muskelzellen.

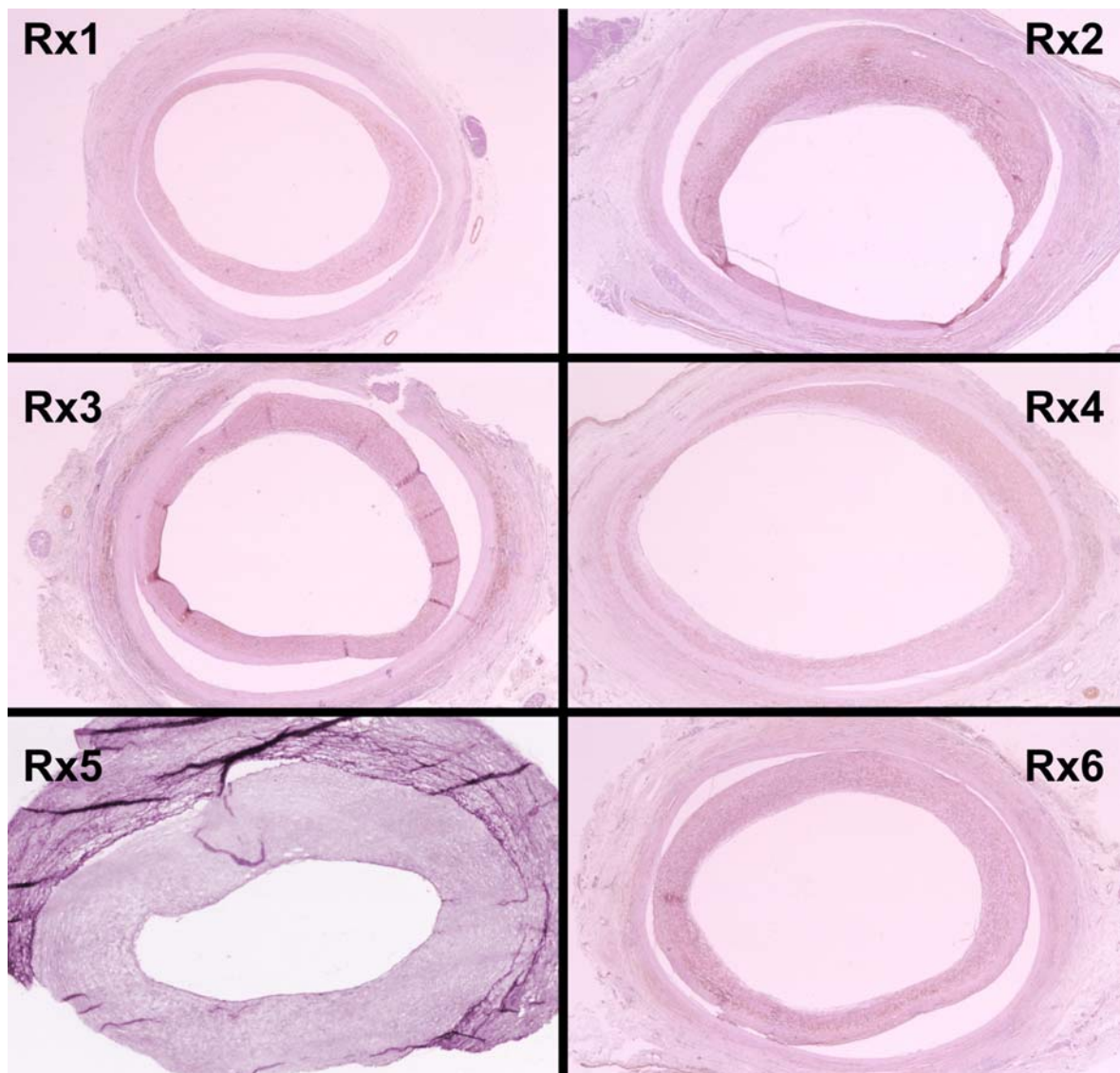


Abbildung 58: Histologie der Aortentransplantate in der MMF Behandlungsgruppe. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhielten die Tiere der Therapie Gruppe vom 45. Tag nach Transplantation an MMF zur Behandlung der bereits fortgeschrittenen Transplantat-Vaskulopathie (TVP). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe entwickelte sich hier die TVP nicht in allen Tieren gleichmäßig: Während Rx1 – Rx4 die MMF Therapie gut tolerierten und eine geringere Intimahyperplasie als die Tiere in der Kontrollgruppe aufwiesen, zeigten die Tiere Rx5 und Rx6 bei schlechter MMF Verträglichkeit eine ungehinderte Entwicklung der Intimaverdickung. α -Actin-Färbung ($\times 20$ – $\times 30$) zur Darstellung der glatten Muskelzellen

b) Morphometrische Messungen

Die morphometrischen Messungen an den histologischen Präparaten und der letzten IVUS Untersuchung an Tag 105 korrelierten zwischen $r^2 = 0,675$; $p = 0,016$ und $r^2 = 0,883$; $p < 0,001$. Trotz der aufwendigen Präservation der Präparate lag die Morphometrie für die Fläche des Gefäßlumens am histologischen Präparat nur bei 41,6% und die Fläche der Intimahyperplasie bei 69,4% der letzten IVUS Messung.

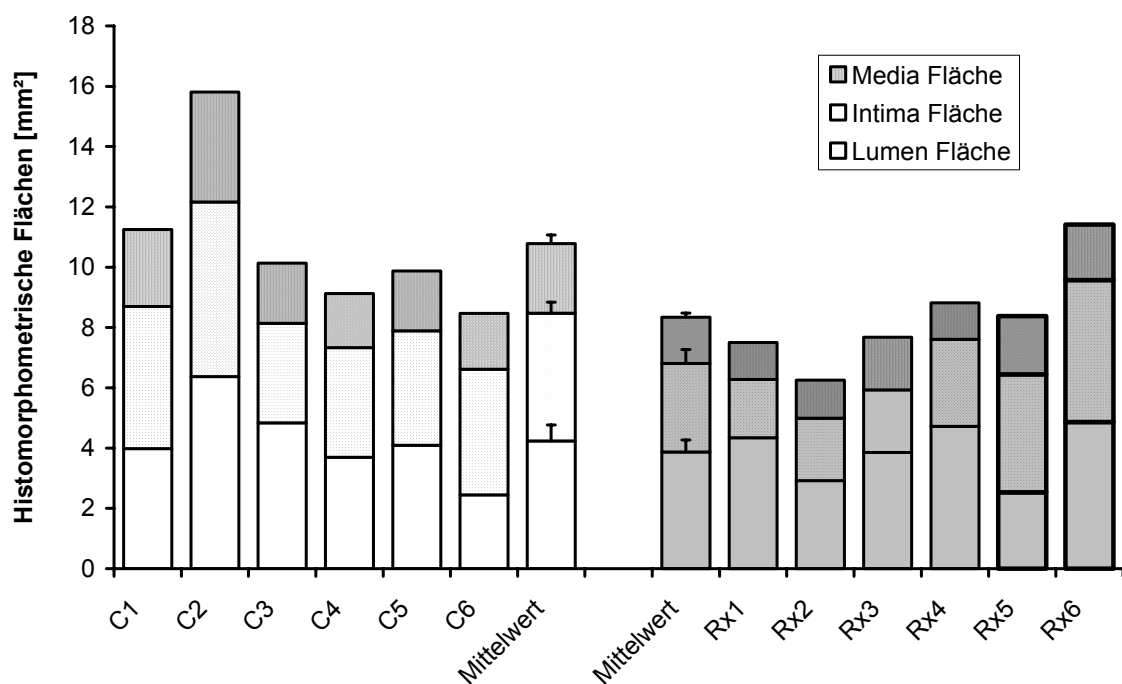


Abbildung 59: Histomorphometrische Bestimmung der mittleren Lumen-, Intima- und Mediaflächen im mittleren Segment des Aortentransplantates. Im Mittel (\pm SEM) erreichten die Unterschiede zwischen der Kontroll- und der MMF Gruppe für die Fläche der Intima ($p = 0,078$) und die Fläche der Media ($p = 0,016$) Signifikanzniveau. Allerdings waren die Messungen durch die postmortale elastische Schrumpfung der Gefäße im Vergleich zur IVUS-Morphometrie nur eingeschränkt verwertbar.

Die Gesamtfläche der Gefäße im mittleren Transplantatdrittel lag in der Kontrollgruppe bei $10,7 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ und in der MMF Gruppe bei $7,6 \pm 0,7 \text{ mm}^2$ ($p = 0,09$). Hierbei war das Lumen zwischen beiden Gruppen vergleichbar (Kontrolle: $4,2 \pm 0,5 \text{ mm}^2$; MMF: $3,9 \pm 0,4 \text{ mm}^2$; $p = 0,6$). Die Unterschiede in den Intimaflächen und den Mediaflächen erreichten Signifikanzniveau: So betrug die mittlere Fläche der Media in der Kontrollgruppe $2,3 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ und in der MMF Gruppe $1,5 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ ($p = 0,016$). Die mittlere Fläche der Intima in der Kontrollgruppe wurde mit $4,2 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ und in der MMF Gruppe mit $2,9 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ vermessen ($p = 0,078$). Die mittlere Intimadicke lag in der Kontrollgruppe bei $504 \pm 44 \text{ }\mu\text{m}$ und in der MMF Gruppe bei $410 \pm 47 \text{ }\mu\text{m}$ ($p = 0,065$).

7. *Korrelationen zwischen Dosis, PK, PD und Intimahyperplasie*

In der Kontrollgruppe bestand keine Korrelation zwischen Ischämiezeit oder der MLR und der Entwicklung der Intimahyperplasie. Auch in der Therapiegruppe hatte die Ischämiezeit keinen Einfluss. Die MLR korrelierte jedoch signifikant mit dem Intimavolumen gemessen mittels IVUS an Tag 105 (Abbildung 60) und der mittleren Intimafläche in der Histomorphometrie ($r^2 = 0,88$, $p < 0,02$). In der Therapiegruppe zeigte die mittlere MMF-Tagesdosis eine hohe Korrelation mit dem Ausmaß der Intimahyperplasie ($r^2 = 0,89$, $p < 0,015$) an Tag 105 (Abbildung 61). Die gemessenen pharmakokinetischen Parameter wie mittlerer MPA-Spiegel oder Tage mit MPA-Spiegel unter $2,0 \text{ mg/l}$ korrelierten nicht mit der Entwicklung der Intimaproliferation.

Die absoluten oder relativen pharmakodynamischen Parameter für Lymphozytenproliferation, CD71 und CD25 Expression auf CD3⁺ Zellen im peripheren Blut zeigten ebenfalls keine Korrelation mit dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie. Zieht man dagegen die inter-individuelle Unterschiede in der MPA-Sensitivität *in vivo* bei den einzelnen Tieren in Betracht, so zeigte sich zwischen der Anzahl der Tage in denen keine annähernd vollständige Hemmung der Lymphozytenproliferation erreicht wurde ($E_{\min} < 95\%$) und dem Intimavolumen an Tag 105 ($r^2 = 0,82$, $p < 0,046$) eine signifikante Korrelation (Tabelle 8).

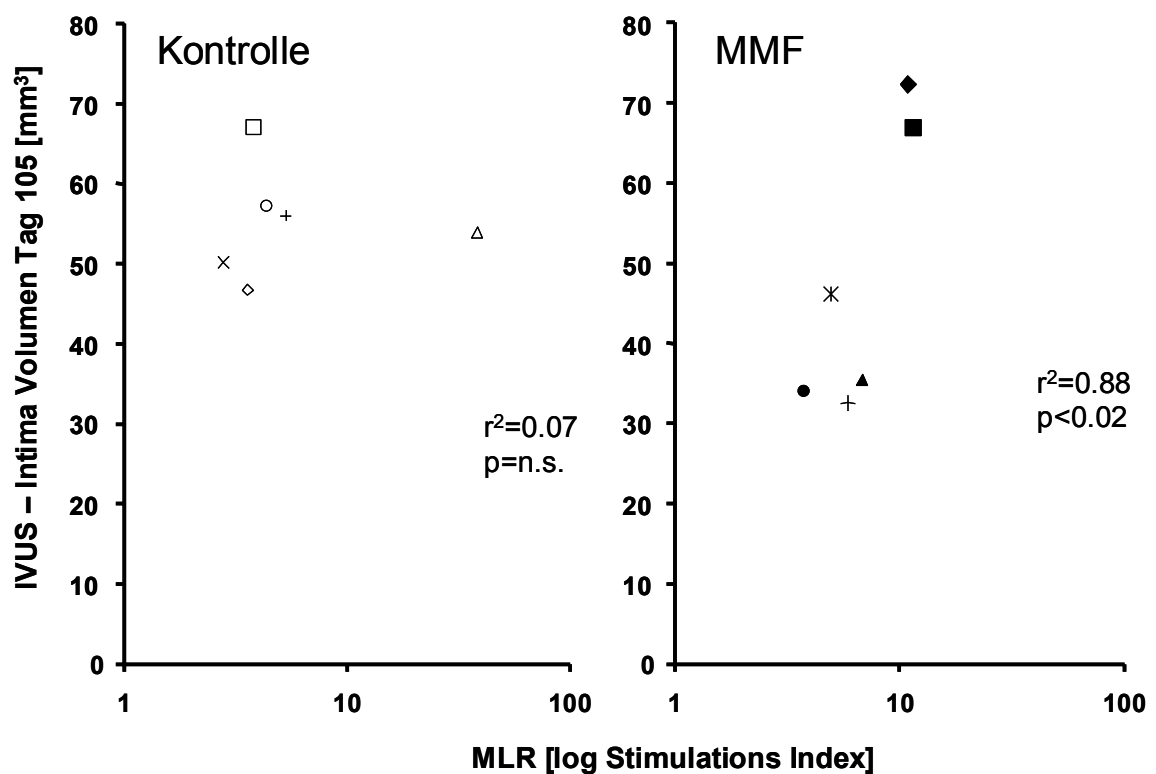


Abbildung 60: Korrelation zwischen dem Stimulationsindex der „Mixed Leucocyte Reaction“ und der Intimahyperplasie gemessen anhand des Intimavolumens an Tag 105 nach Aortentransplantation

Tabelle 8: Korrelation zwischen MLR, Ischämiezeit, MMF Dosis, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie. In der MMF Behandlungsgruppe korrelierten MLR, mittlere MMF Dosis und das Erreichen des 95% E_{min} der Lymphozytenproliferationsrate im peripheren Blut mit der Intimahyperplasie statistisch signifikant.

	IVUS Tag 105	Intima Volumen	Histologie	Intima Fläche
	r^2	p	r^2	p
MLR	0,88	0,02	0,86	0,03
Ischämiezeit	0,18	0,5	0,34	0,3
mittlere MMF Dosis	0,89	0,015	0,85	0,03
mittlere MPA Spiegel	0,07	0,9	0,02	0,9
Tage mit Spiegel < 2,0 mg/l	0,15	0,7	0,21	0,6
mittlere PCNA Expression	0,16	0,7	0,21	0,7
Tage mit PCNA Expression > 5,0 abs%	0,14	0,7	0,10	0,8
Tage mit PCNA Expression < 95% E_{min}	0,82	0,046	0,80	0,058
mittlere CD25 Expression	0,47	0,4	0,41	0,4
mittlere CD71 Expression	0,39	0,5	0,35	0,5

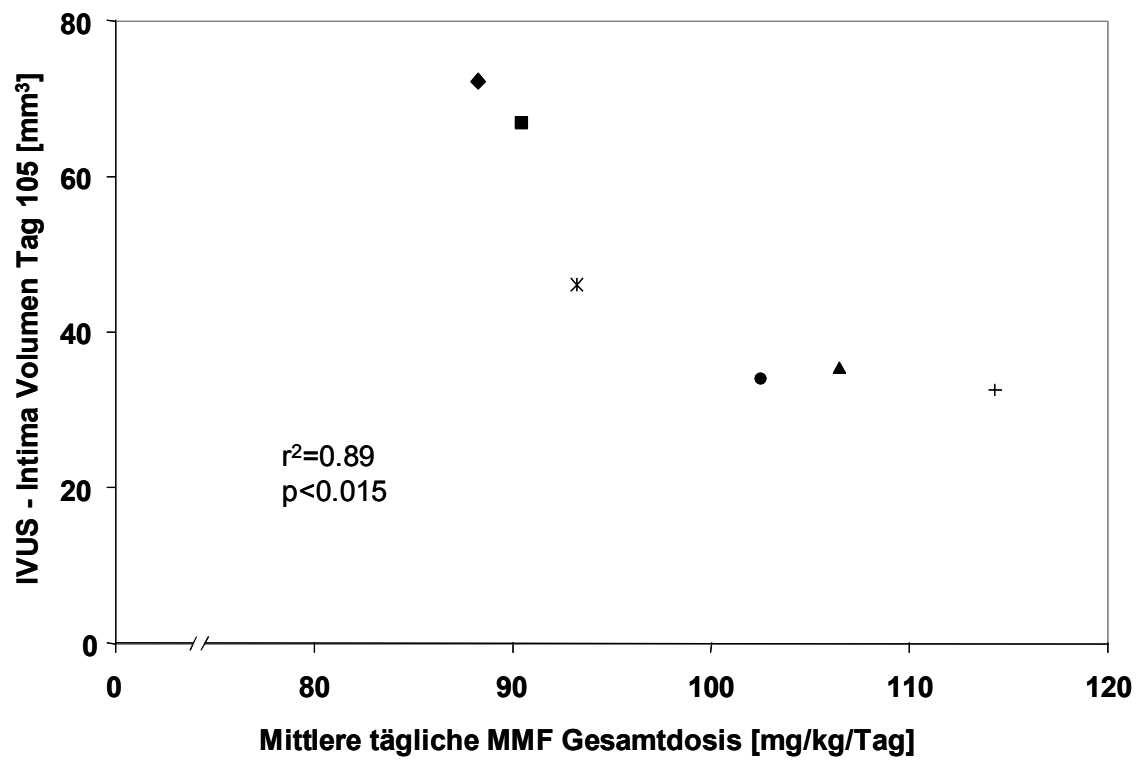


Abbildung 61: Korrelation zwischen der mittleren MMF Dosis pro Tag und dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie.

IV. DISKUSSION

Konventionelle Immunsuppressiva versagen in der Therapie und Prävention der Transplantat-Vaskulopathie (TVP) (Weis und von Scheidt, 1997; Ikonen et al., 2000b). Zur Zeit befinden sich nur wenige Medikamente in der Entwicklung, die in der Lage sein könnten die TVP zu verhindern oder eine bereits etablierte chronische Rejektion zum Stillstand zu bringen. Neben Sirolimus (Gregory et al., 1995; Mohacsi et al., 1997; Ikonen et al., 2000b; Ikonen et al., 2000c) ist hierbei Mycophenolat Mofetil (MMF) das zur Zeit am vielversprechendste Medikament. Außer diesen Wirkstoffen, die beide in der Lage sind glatte Muskelzellen (SMC) in ihrer Proliferation zu hemmen, gibt es nur wenige andere Therapieansätze: HMG-CoA-Reduktase Hemmer (Statine) haben neben ihrer lipidsenkenden Wirkung auch einen Einfluss auf die SMC Proliferation und Migration (Corsini et al., 1995; Bandoh et al., 1996; Corsini et al., 1996; Negre-Aminou et al., 1997) und werden derzeit ebenfalls in präklinischen und klinischen Studien erprobt. Monoklonale Antikörper Behandlungen (Blindt et al., 2000), Serin-Protease-Inhibitoren (Lucas et al., 2000; Hausen et al., 2001), Therapien die Wachstumsfaktoren für glatte Muskelzellen antagonisieren (Foegh et al., 1994; Hayry, 1998) oder Gentherapien (Isobe et al., 2000; Morishita et al., 2000; Suzuki et al., 2000) befinden sich in einem frühen experimentellen Stadium.

A. Bisherige experimentelle Arbeiten

1. Einfluss von MMF auf die Transplantat-Vaskulopathie

Im Gegensatz zu Ciclosporin und Tacrolimus hat Mycophenolat Mofetil neben dem immunsuppressiven Effekt auf Lymphozyten auch einen stark antiproliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen. In einem Experiment wurden die antiproliferativen Effekte von MPA, der aktiven Wirksubstanz von MMF, mit anderen Immunsuppressiva verglichen (Mohacsi et al., 1997): Ciclosporin und Tacrolimus hemmten humane glatte Muskelzellen mit einer IC_{50} von 1 $\mu\text{mol/l}$, einer Konzentration die *in vivo* nicht erreicht werden kann. MPA zeigte zwar einen gleich hohen IC_{50} von 1-10 $\mu\text{mol/l}$, allerdings ist dies eine Konzentration, die in der klinischen Anwendung als MPA-Talspiegel erreicht

wird. Im gleichem Experiment zeigte sich Leflunomide unwirksam und nur Sirolimus erreichte ebenfalls klinisch bedeutsame IC_{50} -Werte von 1-10 nmol/l. In PDGF induzierter glatter Muskelzell-Proliferation in Ratten lagen die erzielten IC_{50} -Werte für MPA zwischen 50 nmol/l und 1 μ mol/l (Allison und Eugui, 1993a; Gregory et al., 1993b; Mohacsi et al., 1997; Moon et al., 2000). Aber MPA war *in vitro* auch bei anderen mesenchymalen Zellen wirksam: Endothelzellen und Fibroblasten wurden ebenfalls in klinisch relevanten Konzentrationen in ihrer Proliferation gehemmt (Allison und Eugui, 1993a).

Auch wenn es bis heute nicht klar ist, ob diese *in vitro* Mechanismen relevant für die Entwicklung der Transplantat-Vaskulopathie *in vivo* sind, so führten diese Erkenntnisse zu einer Reihe von Tierexperimenten, in denen die Wirksamkeit von MMF auf die Transplantat-Vaskulopathie geprüft wurde. Das Ballon-Dilatations-Modell in der Ratte basiert auf dem „Response-to-Injury“ Paradigma von Ross (Ross et al., 1977; Ross, 1990): Unabhängig davon, ob eine alloantigene Immunantwort oder die mechanische Zerreißung den initialen Reiz darstellt, kommt es im Endothel zu einer Zytokin- und Wachstumsfaktoren-Ausschüttung und somit zu einer Proliferation der Mesenchymalzellen (Fellstrom et al., 1999) und der Ausbildung einer TVP ähnlichen konzentrischen Intimahyperplasie. Somit wurden mehrere mechanische Modelle verwendet, um die Wirksamkeit verschiedener Immunsuppressiva in der Hemmung der Intimaproliferation zu testen.

C. Gregory (Gregory et al., 1995) prüfte die Wirksamkeit von Ciclosporin (CsA), Tacrolimus (TRL), Sirolimus (SRL) und Mycophenolsäure (MPA) in einem Rattenmodell: In Sprague Dawley Ratten wurde die linke A. Carotis oder die thorakale bzw. abdominelle Aorta durch eine Ballon-Dilatation verletzt. Ohne jegliche Immunsuppression kam es innerhalb von 14 Tagen zu einer Intimahyperplasie, die $44 \pm 5\%$ des Gefäßquerschnittes ausmachte. CsA (3 mg/kg/Tag) und TRL (4 mg/kg/Tag) verringerten die auftretende Intimahyperplasie nicht ($51,4 \pm 6\%$ bzw. $44 \pm 6\%$). Dagegen lag die Intimahyperplasie unter einer Therapie von 1,5 mg/kg/Tag SRL bei $16,7 \pm 4\%$ und nach der Gabe von 40 mg/kg/Tag MPA bei $23,8 \pm 8\%$. Weder SRL noch MPA waren in der Lage die Entwicklung der Intimahyperplasie vollständig zu verhindern,

zeigten jedoch in Kombination einen zumindest additiven Effekt ($6 \pm 6\%$). In einem ähnlichen Modell (Fraser-Smith et al., 1995) reduzierte MMF (30 mg/kg/Tag) die nach Ballon-Dilatation entstandene Verdickung der Gefäßwand um 17 – 26%. Startete die Therapie 6 Tage vor der Verletzung, so kam es zu einer Reduktion der Intima um 48 – 60%.

Insgesamt scheint der Zeitpunkt des Therapiebeginns in bezug auf das Trauma einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Intimahyperplasie zu haben: So zeigte Gregory (Gregory et al., 1995) in einem anderen Versuch, dass 44 Tage nach Ballon-Dilatation die Intimaflächen gleich waren, unabhängig davon, ob keine Therapie stattfand ($62 \pm 4\%$), MPA und SRL an den Tagen 0 bis 13 ($51 \pm 3\%$) oder an den Tagen 0 bis 30 ($53 \pm 3\%$) in Kombination gegeben wurde. Begann man allerdings mit der Therapie in gleicher Dosis bereits 3 Tage vor dem Setzen der Verletzung, so war auch bei einer Gabe von nur 13 Tagen die Intimahyperplasie an Tag 44 auf $18 \pm 10\%$ reduziert. Dass eine kurzfristige, aber frühestmögliche Applikation eines Immunsuppressivums auch klinisch in der Lage ist eine Intimahyperplasie zu verringern, zeigte Sousa (Sousa et al., 2000): Er verwendete Sirolimus-beschichtete Stents zur Koronar-Angioplastie, die für 15 bzw. 28 Tage Sirolimus freisetzen konnten. Die sonst übliche Restenose-Rate von 30 bis 40% innerhalb von 12 Monaten konnte auf 0% gesenkt werden. Der erste letal verlaufende Re-Infarkt trat bei einem Patienten nach 14 Monaten in einem nicht mit Stent behandeltem Stromgebiet auf.

Auch in einem anderen nicht-allogenen Modell wurde MMF auf seine Wirksamkeit getestet (Schreiber et al., 1998): Neuseeland Kaninchen erhielten unter einer Cholesterin-reichen Diät 80 mg/kg/Tag MMF für 4 Wochen. Während sich in der unbehandelten Kontrollgruppe eine Arteriosklerose entwickelte, zeigte sich in den Aorten der mit MMF behandelten Tieren eine grenzwertig nachzuweisende Reduktion der arteriosklerotischen Plaques, der Makrophagen Infiltration und der Schaumzellbildung.

Das klassische allogene Modell zur Untersuchung der Transplantat-Vaskulopathie untersucht die Entwicklung der Intimahyperplasie in den Koronararterien nach heterotoper Herztransplantation im Rattenmodell. So behandelte Morris (Morris et al.,

1991) Lewis-Empfänger von BN-Herzen mit 30 mg/kg/Tag MPA für die ersten 50 Tage nach Transplantation und reduzierte danach die Dosis auf 20 mg/kg/Tag bis zum Versuchsende am Tag 101. Diese Studie zeigte, dass MPA zwar in der Lage war die Inzidenz und Schwere der Transplantat-Vaskulopathie zu vermindern, aber nicht die chronische Rejektion vollständig vermeiden konnte. In einem anderen Modell (Fisher auf Harlan Sprague Dawley) zeigte sich eine nieder- (0,5 mg/kg/Tag) und hochdosierte (5 – 2,5 mg/kg/Tag) Sirolimus-Therapie wirksam in der Prävention einer Transplantat-Vaskulopathie. Nach 100 Tagen wurde die Intimahyperplasie von $59 \pm 7\%$ in der Kontrollgruppe auf $22 \pm 11\%$ bzw. auf $10 \pm 3\%$ gesenkt. In gleichem Modell war eine mittelhohe Dosis von MMF (20 mg/kg/Tag) nicht in der Lage die Intimahyperplasie zu vermeiden: Nach 100 Tagen lag die Intimahyperplasie bei $52 \pm 13\%$ und der Unterschied zur Kontrollgruppe war nicht signifikant (Schmid et al., 1995).

In einem Nierentransplantations-Modell (Fisher auf Lewis) zeigte sich MMF in einer Dosis von 15 mg/kg/Tag wirksam (Azuma et al., 1995): Nach 52 Wochen lag die arterielle Obliteration der Nierengefäße zwischen 10,8 und 11,3% in den MMF Gruppen, wohingegen ohne Therapie die Gefäße zu 63,8% verschlossen waren. Die Wirksamkeit von MMF wurde aber auch in einem Xenotransplantationsmodell (heterotope Herztransplantation Cynomolgus Affen auf Paviane) getestet (O'Hair et al., 1994). Ein Jahr nach der Transplantation war MMF (70 mg/kg/Tag) in Kombination mit CsA und Methylprednisolon wirksam in der Prophylaxe von Intimaveränderungen der Koronararterien. In der Azathioprin-Kontrollgruppe entwickelten die Tiere dagegen eine ausgeprägte Intimahyperplasie.

Isolierte Gefäßtransplantate haben den Vorteil, dass die Entwicklung der Transplantat-Vaskulopathie ohne die Notwendigkeit einer initialen Immunsuppression zur Verhinderung der akuten Rejektion untersucht werden kann (Hayry et al., 1991; Mennander et al., 1991). Daher etablierten sich tierexperimentelle Modelle, bei denen periphere Arterien (Gregory et al., 1993a; Morris et al., 1995) oder die abdominelle Aorta (Hullett und Sollinger, 1993; Steele et al., 1993; Raisanen-Sokolowski et al., 1994; Stoltenberg et al., 1994) transplantiert wurden.

In einem Rattenmodell untersuchte Steele (Steele et al., 1993) die Wirksamkeit verschiedener Immunsuppressiva nach allogener Aortentransplantation: Während nach dreimonatiger Therapie mit CsA (2,5 mg/kg/Tag) und Brequinar (12 mg/kg 3 x pro Woche) kein Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte, verringerte sich die Intimaproliferation unter der Therapie mit MMF (40 – 30 mg/kg/Tag) signifikant um 76,1%. Eine Kombinationstherapie mit einer erniedrigten Dosis von MMF (20 mg/kg/Tag) und Brequinar (6 mg/kg 3 x pro Woche) zeigte keine Wirksamkeit in diesem Modell. In einer nachfolgenden Studie (Hullett et al., 1996) wurde der Effekt einer verzögerten Gabe von MMF getestet: Hier wurde mit 40 mg/kg/Tag für 14 Tage und anschließender Reduktion auf 30 mg/kg/Tag zwei oder vier Wochen nach Transplantation begonnen. Wurde die Therapie 2 Wochen verzögert gestartet, reduzierte sich die Intimahyperplasie um 35,4% ($p = \text{n.s.}$) und wurde mit der Therapie um 4 Wochen verzögert begonnen, reduzierte sich die Intimahyperplasie um 42,3% ($p = 0,01$). Im Vergleich zur syngeneten Kontrollgruppe war die auftretende Intimahyperplasie allerdings signifikant.

Eine andere Arbeitsgruppe (Raisanen-Sokolowski et al., 1994; Raisanen-Sokolowski et al., 1995b) zeigte, dass eine Dosis von 20 mg/kg/Tag MMF nach 3 Monaten das Auftreten einer chronischen Rejektion verhinderte. Intima-Verdickung, Media-Nekrose und periadventitielle Entzündung wurden signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe reduziert. Allerdings war MMF in diesem Modell nicht in der Lage, diesen Effekt auf Dauer zu erhalten. Zwölf Monate nach Transplantation war kein Unterschied zu unbehandelten Kontrollgruppe zu erkennen (Raisanen-Sokolowski et al., 1995a).

2. *Aortentransplantationsmodell im Primaten*

Auch wenn die Verwendung des Aortentransplantationsmodells in der Ratte eine Neointima-Proliferation aufzeigt, die der humanen Situation während einer chronischen Rejektion ähnelt, so hat dieses Modell jedoch auch seine Nachteile: Ohne den Einsatz von Immunsuppressiva werden die allogen transplantierten Aorten innerhalb von 10 bis 14 Tagen fibrotisch und zunehmend azellulär (Plissonnier et al., 1995). Zudem tendieren diese Rattenmodelle dazu, die Effektivität von Immunsuppressiva über zu bewerten (Ikonen et al., 2000a). So zeigte beispielsweise auch CsA in mehreren Arbeiten im

Rattenmodell seine Wirksamkeit (Stoltenberg et al., 1994; Stoltenberg et al., 1995; Little et al., 1996), obwohl sich chronische Rejektionen in der klinischen Situation unter CsA Gabe entwickeln. Aus diesen Gründen wurde das in dieser Studie verwendete Aortentransplantationsmodell im Primaten entwickelt (Ikonen et al., 2000a). Es konnte gezeigt werden, dass die auftretende Intimahyperplasie allogen-abhängig ist und nicht bei einer Autotransplantation auftritt. Ferner waren die histologischen Veränderungen nicht von dem humanen Bild einer Transplantat-Vaskulopathie bei einer chronischen Rejektion zu unterscheiden. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass mit der intravaskulären Ultraschall Untersuchung (IVUS) die Entwicklung der Transplantat-Vaskulopathie verfolgt werden kann und *in vivo* Messungen erfolgen können. Die IVUS – Morphometrie ist der Histomorphometrie überlegen, da es *post mortem* durch die Eigen - Elastizität der Aorta zu einer Schrumpfung des Gefäßes kommt und der Gefäßquerschnitt in der Histologie zumindest um 25% reduziert ist (Ikonen et al., 2000a).

3. MMF Pharmakokinetik und Toxizität im Primaten

Nach verschiedenen oralen Dosen von MMF werden maximale MPA Blutspiegel im Cynomolgus Affen innerhalb von 1,5 Stunden erreicht und die Halbwertszeit liegt bei 8 Stunden (Morris et al., 1991; Morris, 2001). Die toxikologischen Daten, die für Cynomolgus Affen vorliegen, sind begrenzt: Die Dosis von 150 mg/kg MMF pro Tag erwies sich als toxisch und führte zu deutlichen gastrointestinalen Nebenwirkungen und Gewichtsverlusten, bzw. zum Studienabbruch innerhalb von weniger als 4 Wochen (Eugui, 2001). 70 mg/kg MMF pro Tag führten zum Studienabbruch innerhalb von 3 Monaten aufgrund einer Herpes-B-Infektion (Chellman et al., 1992; Eugui, 2001). Morris et al. (Morris et al., 1991) berichteten, dass nach heterotoper Herztransplantation ein Tier bei einer Dosis von 125 mg/kg/Tag nach 29 Tagen an Marasmus bei Malaria-Infektion verstarb. Ein Tier überlebte bei einer Dosis von 125 – 150 mg/kg/Tag 50 Tage. Alle Tiere zeigten eine gastrointestinale Toxizität und einen ausgeprägten Gewichtsverlust. Tiere die mit 125 mg/kg/Tag MMF behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere Hemmung der Proliferation von mononucleären Zellen als Tieren, die mit 70 mg/kg/Tag behandelt wurden und 50 mg/kg/Tag wurde als subtherapeutische Dosis angesehen (Morris et al., 1991; Morris, 2001).

B. Optimierung der Tier-experimentellen MMF Gabe

Aus den bisher dargestellten Erkenntnissen läßt sich die Problematik bei der Planung dieser Studie wie folgt zusammen fassen: Die Mehrzahl der bisher veröffentlichten Studien läßt erkennen, dass MMF einen Effekt auf die Entwicklung der Transplantat-Vaskulopathie zu haben scheint. Hierzu sind im Rattenmodell allerdings hohe, zum Teil toxische Dosen von 30 - 40 mg/kg/Tag notwendig (Morris et al., 1991; Steele et al., 1993; Fraser-Smith et al., 1995; Gregory et al., 1995). Bei niedrigeren Dosen wird das Bild uneinheitlich und je nach Modell kann MMF wirksam in der Prävention der Transplantat-Vaskulopathie sein (Raisanen-Sokolowski et al., 1994; Raisanen-Sokolowski et al., 1995b) oder nicht (Schmid et al., 1995). Auch wenn in den vorgestellten Modellen die Unterschiede zur Kontrollgruppe signifikant waren, ließ sich aber eine Intimahyperplasie nie vollständig verhindern (Morris et al., 1991). Gerade im längeren Verlauf nach Transplantation (Raisanen-Sokolowski et al., 1995a) oder bei verzögertem Therapiebeginn ließ die Wirksamkeit von MMF nach (Gregory et al., 1995; Hullett et al., 1996).

In dieser Studie wurde geprüft, ob MMF in der Lage ist, in dem vorbeschriebenen Primatenmodell eine bereits etablierte Transplantat-Vaskulopathie zu behandeln. Dieses anspruchsvolle Modell neigt, im Gegensatz zu den Rattenmodellen nicht dazu die Wirksamkeit von Immunsuppressiva zu überbewerten (Ikonen et al., 1999; Ikonen et al., 2000c) und entspricht weitgehend der humanen Transplantat-Vaskulopathie bei chronischer Rejektion. Um die Frage nach der Wirksamkeit von MMF hier beantworten zu können, wurde gefordert, dass MMF in einer maximal tolerierten Dosis (MTD) verabreicht werden sollte. Um diese zu ermitteln, waren extensive Vorstudien notwendig.

Im klinischen Alltag wird MMF aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften mit einem t_{\max} von 1h und einer Halbwertszeit von 16 Stunden (Bullingham et al., 1996a; Bullingham et al., 1996b; Bullingham et al., 1998) zweimal täglich verabreicht. Obwohl die Halbwertszeit in der Ratte mit 6 – 8 h (Gummert et al., 1999a) und im Affen mit 8 h nochmals deutlich kürzer ist, wurde in keinem bisher durchgeführten Tierexperiment die Tagesdosis von MMF auf mehrere Einzeldosen verteilt. Zu prüfen war also zunächst, ob

das Dosierungsintervall einen direkten Einfluss auf die immunsuppressive Wirksamkeit von MMF hat.

Hierzu wurde das etablierte Modell der heterotopen Herztransplantation (Ono und Lindsey, 1969) zwischen den Stämmen Brown Norway und Lewis benutzt. Aus Vorversuchen (Morris und Wang, 1991; Gummert et al., 1999a) war bekannt, dass in diesem Modell mittelhohe Dosen von MMF nicht in der Lage sind, die innerhalb von einer Woche auftretende akute Rejektion vollständig zu verhindern. Somit war das von Margret Billingham (Billingham et al., 1990) etablierte Grading System für akute Rejektionen im Rattenherz ein idealer Endpunkt um Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Therapieregime aufzudecken. Um zusätzliche Details über die Dauer der MMF Wirksamkeit zu erhalten, wurden pharmakodynamische Messungen durchgeführt und zur Studiauswertung hinzugezogen.

Zunächst ging es um die Festlegung der geeigneten MMF Dosis, der Zeitpunkte für die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Analysen und der Dauer des geplanten Ratten-Transplantations-Versuches. In Studie 101 wurde MMF in verschiedenen Dosierungen zwischen 5 und 20 mg/kg/Tag als einmal tägliche (QD) und zweimal tägliche (BID) Gabe getestet. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Gummert et al., 1999a; Barten et al., submitted) wurden engmaschige Analysezeitpunkte benutzt, um ein möglichst genaues Abbild der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu erhalten. Spitzenspiegel wurden innerhalb von 30 Minuten erreicht und 24 Stunden nach Erstgabe war MPA noch bei allen Gruppen im Plasma nachweisbar. Wie zu erwarten war die 24h Exposition abhängig von der MMF-Tagesdosis und nicht vom Dosierungsintervall. Wie in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt, war demnach die MPA-AUC₀₋₂₄ für die Gruppen 5 mg/kg/Tag BID und 10 mg/kg/Tag QD vergleichbar. Die MPA-Plasmakonzentration der 5 mg/kg/Tag BID Gruppe glich in den ersten 12 Stunden der von der 5 mg/kg/Tag QD Gruppe und im anschließenden Intervall der von der 10 mg/kg/Tag QD Gruppe. Entsprechend der Halbwertszeit lagen die Talspiegel, 24 h nach der Erstgabe gemessen, in den BID Gruppen höher als in den vergleichbaren QD Gruppen.

In Studie 101 wurde parallel zur Pharmakokinetik in pharmakodynamischen Analysen die Reversibilität der Inhibition der Lymphozytenproliferation und -Aktivierung untersucht. Bei einer Gabe von mehr als 5 mg/kg MMF (Abbildung 24) kam es innerhalb von 30 Minuten zu einer vollständigen Hemmung der Lymphozytenproliferation. Bei allen QD Gaben, mit Ausnahme der 20 mg/kg/Tag, kam es ab dem 18 Stunden Zeitpunkt zu einer Erholung der Proliferationsrate. In beiden BID Gruppen zeigte sich dagegen eine Inhibition, die mit der 20 mg/kg QD Gabe vergleichbar war. Gleichartige Ergebnisse wurden für die CD71, CD25, CD11a und CD54 Oberflächen Antigene auf T Zellen ermittelt.

Für das nachfolgende Rattenexperiment 102 wurden die Niedrigdosis - Gruppen 5 mg/kg/Tag BID und 10 mg/kg/Tag QD ausgewählt. In einer nachfolgenden Studie, deren Ergebnisse hier nicht aufgeführt sind, wurden auch die Hochdosis - Gruppen miteinander verglichen (Klupp et al., submitted-b). Aus vorhergehenden Studien war abzuleiten (Gummert et al., 1999a; Barten et al., submitted), dass nach 8 Tagen in der QD Gruppe ein Rejektionsgrad 3 zu erwarten ist. Da hier bereits einige Tiere das Herz vollständig abgestoßen hatten, wurde die Studiendauer in der Studie 102 auf 7 Tage verkürzt. Die Zeitpunkte für die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Analysen wurden beibehalten, allerdings wurde aufgrund der aufgetretenen Anämie in Studie 101 der Untersuchungszeitraum von 36 auf 24 Stunden verkürzt und somit zwei Blutentnahmen eingespart.

In Studie 102 konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Gesamt MMF Tagesdosis von 10 mg/kg/Tag auf zwei Einzeldosen zu einer signifikanten Verringerung des Rejektionsgrades führte. Hierbei waren die AUC_{0-24} für MPA in beiden Gruppen gleich und nur das MPA-Profil unterschied sich bezüglich C_0 , C_{max} , und AUC_{12-24} signifikant (Abbildung 25 und Abbildung 26). Deutlicher als die Pharmakokinetik spiegelten die pharmakodynamischen Parameter die Wirksamkeit der verschiedenen MMF Regime wider: Während in der BID Gruppe die Lymphozytenproliferation über den gesamten 24 Stunden Zeitraum zumindest zu 50% unterdrückt war (Abbildung 24), kam es in der QD Gruppe zu einer deutlichen Erholung der Proliferationsrate. Die PCNA-AUE₀₋₂₄, als Maß der MMF Wirksamkeit auf die Proliferationsrate mononucleärer Zellen, stieg durch die

Optimierung der MMF Gabe bei gleicher MMF Tagesdosis und vergleichbarer MPA-AUC₀₋₂₄ signifikant an ($p < 0,001$). Dieses korrelierte hoch mit dem Rejektionsgrad ($r^2 = 0,85$, $p < 0,001$). Aber auch die Hemmung der Lymphozytenaktivierung durch MMF bzw. MPA, gemessen an der Expression des Transferrin-Rezeptors auf T Zellen, spiegelte die große Unterschiedlichkeit zwischen der im Tiermodell standardmäßig genutzten QD Dosierung und der entsprechend der MMF Pharmakokinetik optimierten BID Gabe wider. Nach der Morgendosis führte die niedrigere BID Dosis und die höhere QD Dosis in gleichem Maße zur Hemmung der CD71 Expression (Abbildung 28). In der QD Gruppe kam es nach dem 12 h Zeitpunkt zu einer signifikanten und vollständigen Erholung der CD71 Expression, während diese in der BID Gruppe supprimiert blieb. Auch dieses korrelierte hoch mit der MMF Effektivität ($p < 0,002$). Zusammenfassend konnte aus beiden Rattenstudien geschlossen werden, dass bei gleicher MMF-Tagesdosis die Verteilung auf zwei Einzelgaben die Wirksamkeit dieses Immunsuppressivums signifikant erhöht.

Parallel zu den Rattenstudien 101 und 102 lief die Evaluation von MMF im Primaten (Studie 201). Hier wurden neben der Untersuchung der Pharmakokinetik und Toxizität auch die Voraussetzungen geschaffen, um die geplante Aorten-Transplantationsstudie 301 sicher und effektiv durchführen zu können. Die Pharmakodynamik als Instrument zur Evaluation der *in vivo* Effektivität von MMF wurde aus dem Rattenmodell ins Primaten-Modell transferiert (Klupp et al., 2001a; Klupp et al., submitted-a). Dazu mußten neue Assays entwickelt und die Dosierung der Mitogene sowie die Stimulationsdauer im Vollblutassay neu optimiert werden. Verschiedene Zeitpunkte für die Blutentnahmen für die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Analysen wurden getestet. Die HPLC Bestimmung für MPA mußte für das Affenplasma validiert werden.

In vivo wurde die Pharmakokinetik, die Pharmakodynamik und die Toxizität einer 100 mg/kg MMF QD Tagesdosis geprüft. Hierbei zeigte sich, dass diese Dosis bei allen 4 Tieren innerhalb von 14 Tagen zu einer erheblichen Toxizität führte und somit mußte bei 2 Tieren nach 2 Wochen und bei 2 weiteren Tieren nach 3 Wochen die Dosis reduziert werden. Hierbei stand der Gewichtsverlust im Vordergrund und die Tiere verloren in dieser Zeit bis zu 19,4% ihres Ausgangsgewichtes. Da aufgrund der ethischen

Vertretbarkeit der Versuche höhere oder länger dauernde Gewichtsverluste nicht zu tolerieren sind (Stanford University, 1999) schied eine Dauerbehandlung mit 100 mg/kg/Tag MMF QD aus. Nach Dosisreduktion auf 50 mg/kg/Tag MMF QD waren die Toxizitätszeichen reversibel, wobei das Gewicht sich schnell erholte, die Diarrhoe aber bei 2 von 4 Tieren bis zum vollständigen Absetzen von MMF fortbestand.

Die MMF Reinsubstanz wurde bei diesen Versuchen im gleichen Vehikel wie bei den Rattenexperimenten verabreicht. Bei den niedrigeren Einzeldosen konnte im Rattenexperiment mit maximal 4 mg MMF pro Milliliter Vehikel eine vollständige Lösung erzielt werden. Bei einem Löslichkeitspunkt von 4,3 mg/ml bei einem pH von 3,4 war bei den Primatenversuchen mit dieser Darreichungsform in einer notwendigen Konzentration von 64 mg/ml nur eine Suspension zu erzielen. Trotz eines Methyl-Cellulose (CMC) - Anteils war die Viskosität der MMF-Suspension zu gering, so dass sich MMF innerhalb von Sekunden absetzte und ein Konzentrationsgradient innerhalb der Suspension entstand. Eine Erhöhung des CMC Anteils des Vehikels brachte keine wesentlichen Vorteile. Auch Versuche MMF zu kapsulieren oder in schmackhaftem Futter zu verstecken führten zu keiner sicheren MMF Applikation. Letztendlich mußte jede MMF Einzeldosis für jedes Tier separat ausgewogen und suspendiert werden. Die Tiere wurden über eine Magensonde unter Ketamin-Sedierung therapiert.

Die pharmakokinetischen Untersuchungen zeigten eine hohe Inhomogenität in den erzielten MPA Spiegeln. Inwieweit diese durch die unsichere bzw. ungenaue MMF Applikation hervorgerufen oder durch Unterschiede in der oralen Resorption ausgelöst wurde, blieb während des Versuchs unklar. Nach erster Applikation variierten die 2 h MPA-Werte zwischen 1,8 und 22,8 mg/l. Nach 7 Tagen waren die Unterschiede zwar geringer, aber dennoch lag die Varianz der Tal- und 2 h Spiegel noch deutlich höher als bei den Rattenexperimenten. Eine geringere Varianz zeigte die pharmakodynamischen Bestimmungen: Die Lymphozytenproliferation war nach einwöchiger 100 mg/kg/Tag MMF QD Gabe um 85% reduziert und die Variation lag bei nur $\pm 3,2\%$. Hierbei war der pharmakodynamische Effekt mit nur minimalen Schwankungen konstant über das 24 Stunden Intervall nachweisbar.

Im Gegensatz dazu, zeigte sich in der 50 mg/kg/Tag MMF QD Dosierung eine deutliche Erholung der Lymphozytenproliferation und –aktivierung (Abbildung 34). Unter der Annahme der bisher im Primaten noch nicht bewiesenen Hypothese, dass die Pharmakodynamik die immunsuppressive Effektivität von MMF widerspiegelt, wurden folgende Schlüsse aus der Studie 201 gezogen: 1.) Die orale Gabe von MMF in Form einer Suspension erzielt keine konstanten MPA Spiegel. 2.) Die Dosis von 100 mg/kg/Tag MMF QD zeigt zwar eine effektive immunsuppressive Wirkung, ist aber toxisch und wird nicht über den geplanten Studienzeitraum von mehr als 50 Tagen zu verabreichen sein. 3.) Die Dosis von 50 mg/kg/Tag MMF QD zeigt eine tolerierbare Toxizität, hat aber eine nur subtherapeutische immunsuppressive Wirksamkeit.

Die MMF Toxizität korreliert beim Menschen nicht nur mit der MMF Dosis, sondern auch mit den erreichten MPA-Spitzenpiegeln (van Gelder et al., 1999). Daher und von den Ergebnissen der Studie 101 bis 201 ausgehend, war zu fordern, dass MMF in der Aorten-Transplantationsstudie zweimal am Tag verabreicht werden musste, um ein optimales Verhältnis zwischen minimaler Toxizität und maximaler Effektivität zu erreichen. Um eine Alternative zur oralen Therapie mit der MMF Suspension zu prüfen, wurde in der zweiten Vorstudie im Primatenmodell (Studie 202) die subkutane Applikation von MMF getestet. Hierzu wurde die zugelassene IV-Applikationslösung von MMF, CellCept-IV[®], verwendet und 500mg MMF in 14 ml Glucose 5% gelöst (35,7 mg/ml). Die Gesamt-Tagesdosis von 100 mg/kg wurde in zwei Einzeldosen aufgeteilt. Damit wurden innerhalb von zwei Stunden nach Erstgabe effektive MPA-Plasmaspiegel erzielt. Diese waren homogen und lagen bei 12 mg/l. Die erreichten Talspiegel lagen ebenfalls in einem klinisch-therapeutischen Bereich (Nicholls, 1998; Shaw et al., 1998; Meiser et al., 1999; van Gelder et al., 1999) von 1,8 – 4,8 mg/l. Nach 14 Tagen Therapie bestätigte sich diese homogene und schnelle Absorption. Die Talspiegel lagen zwischen 6 und 9,4 mg/l und es wurden keine Spitzenpiegel von mehr als 15 mg/l erreicht. Auch die Toxizität war mit maximal 7,3% Gewichtsverlust nach 14 Tagen verringert. Jedoch trat auch bei subkutaner Applikation von MMF eine Diarrhoe auf, was durch den enterohepatischen Kreislauf von MPAG bzw. MPA zu erklären ist. Zu lokalen Hautreizungen an den Applikationsstellen kam es während dieser Vorstudie nicht. Abschließend wurde noch die orale Resorption von CellCept-IV[®] bei 4 Tieren nach

Erstapplikation geprüft: Die Zubereitung des Medikamentes war sicherer und schneller als in der ursprünglichen Formulierung und die Variation der erreichten MPA-Spiegel war geringer. Jedoch waren in einem von vier Tieren keine suffizienten MPA-Plasmaspiegel zu erzielen.

In Konsequenz aus den Berichten der Literatur, den Informationen von Roche Bioscience und den eigenen Vorarbeiten wurde folgendes Medikationskonzept für die Aortentransplantation ausgearbeitet:

Mit der MMF Therapie sollte am Tag 45 nach allogener Aortentransplantation in einer Dosis von 50 mg/kg/Tag BID subkutan begonnen werden. Anhand der in kurzen Intervallen angefertigten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Analysen, sowie den auftretenden Toxizitätszeichen sollte die MMF Dosis täglich angepaßt werden. Um hohe MMF Tagesdosen zu ermöglichen waren auftretende Toxizitäten mittels Zufütterung, enteraler Sondenernährung und Loperamid-Gaben frühzeitig zu behandeln.

C. Einfluss von MMF auf die Transplantat-Vaskulopathie im Primaten

1. Aortenmodell und TVP in der Kontrollgruppe

Die Intimahyperplasie entwickelte sich in der unbehandelten Kontrollgruppe entsprechend des vorbeschriebenen Modells (Ikonen et al., 2000a; Ikonen et al., 2000b). Auch wenn der initiale Anstieg bei diesen Tieren langsamer und die Differenz zwischen IVUS-Untersuchungstag 42 und 21 noch nicht statistisch signifikant war, so kam es unmittelbar danach zu einer raschen Intimaproliferation und einem hoch signifikantem Anstieg bis zum Tag 63 nach Transplantation ($p < 0,02$). Hiernach flachte sich die Kurve ab und erreichte am Ende der Studie an Tag 105 ihr Maximum mit einem Volumen im mittleren Drittel von $55,2 \pm 2,8 \text{ mm}^3$. Gefäß- und Lumenvolumina nahmen signifikant ab, ohne dass es dabei zu einer Blutdruck relevanten Stenose gekommen war.

Im Gegensatz zu den Vorarbeiten (Ikonen et al., 2000a; Ikonen et al., 2000b) waren die Ischämiezeiten während der Transplantation deutlich kürzer ($54 \pm 6,4$ vs. $132 \pm 66,3$ min) und es traten weder Anastomosenstenosen, noch Thrombosen mit nachfolgender Ischämie der unteren Extremitäten auf. Kein Tier mußte aufgrund von Komplikationen von der Studie ausgeschlossen werden. Der bei einem Tier auftretende postoperative Ileus, konnte chirurgisch behandelt werden und heilte komplikationslos und ohne Einfluss auf die sich entwickelnde Intimahyperplasie ab. Der postoperative Gewichtsverlauf zeigte, dass sich alle Tiere rasch von der Transplantation erholten und die sich entwickelnde Transplantat-Vaskulopathie keinen Einfluss auf das Allgemeinbefinden hatte.

In der Kontrollgruppe zeigte die Histologie ein morphologisches Bild, das dem der humanen chronischen Rejektion entsprach: Die Gefäße wiesen mittel- bis schwergradige Veränderungen im Sinne einer Transplantat-Vaskulopathie (Billingham et al., 1990; Billingham, 1994) mit konzentrischer Lumeneinengung, frakturierter M. elastica interna und perivaskulärer Infiltrate auf. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine ausgeprägte glatte Muskelzellinfiltration in der Intima. In der morphometrischen Vermessung zeigte sich, dass die Flächen für das Gesamtgefäß bzw. für die Intima um ca. 50% kleiner waren, als die korrespondierenden Flächen bei der letzten IVUS Untersuchung *in vivo*. Trotz der aufwendigen Präservierung der Aorten-Allografts mit *in situ* Perfusion mit Formalin und anschließender 18 stündiger Fixierung mit einem intravasalen Druck von 100 mmHg kam es zu einer elastischen Schrumpfung der Gefäße. Daher sind die histomorphometrischen Vergleiche zwischen Kontroll- und Therapiegruppe weniger valide als die Ergebnisse der IVUS Morphometrie.

2. Toxizität, PK und PD in der MMF Gruppe

Durch die Erfahrungen in den Vorversuchen gelang es während dieser Studie eine mittlere MMF Dosis von $99,2 \pm 4,2$ mg/kg/Tag zu erreichen. Hierunter waren die auftretenden Toxizitäten von MMF gut behandelbar. Durch die Aufteilung der Gesamtdosis in zwei Einzeldosen und die supportive Therapie mit Hyperalimentationnahrung und Antidiarrhoika mußte die MMF Therapie nur in 4 von 6

Tieren zeitweilig unter die Anfangsdosis von 100 mg/kg reduziert werden. In 2 Tieren wurde die Dosis auf unter 50 mg/kg/Tag für eine kurze Frist verringert und in keinem Fall wurde die Therapie ganz abgesetzt. Unter diesem Therapieregime kam es zu einem tolerierbaren Gewichtsverlauf: Das mittlere Körpergewicht war am Ende der Studie zwar signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, der maximale Gewichtsverlust lag jedoch nur zwischen 2,5 und 14,2%. Allerdings zeigten die Tiere laborchemische Zeichen einer Hypoalimentation. Schwerwiegende MMF assoziierte Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Ulzera oder Pankreatitiden traten nicht auf. Ebenso kam es zu keiner Knochenmarkstoxizität. Diarrhöen und Erbrechen traten jeweils nur kurzfristig auf und waren nach Dosisreduktion reversibel.

Der Beginn der Therapie mit subkutaner Applikation von MMF führte von Anfang an zu guten MPA-Plasma-Talspiegeln und einer effektiven Hemmung der Lymphozytenproliferation im peripheren Blut. Allerdings traten im Gegensatz zur Vorstudie lokale, entzündliche Hautveränderungen an den Injektionsstellen auf, so dass MMF ab dem 9. Therapietag oral appliziert werden mußte. In den pharmakokinetischen Messungen war kein Unterschied zwischen vor und nach der Umstellung auf die orale Applikation zu erkennen und in den pharmakodynamischen Messungen war nur ein kurzer, vorübergehender Anstieg der Proliferationsrate zu erkennen. Insgesamt zeigten die MPA-Plasmaspiegel eine hohe Variation auf, die auch aus verschiedenen klinischen Studien bekannt ist (Meiser et al., 1999; van Gelder et al., 1999; Jain et al., 2001). Bis heute ist es noch umstritten, ob ein klinisches Monitoring von MMF der fixen Dosis überlegen ist (Bullingham et al., 1998; Nicholls, 1998; Shaw et al., 1998; Meiser et al., 1999; van Gelder et al., 1999; Jain et al., 2001; Shaw et al., 2001). Das hier durchgeführte pharmakodynamische Monitoring ist experimentell und wurde in dieser Form bisher nur im Rattenmodell (Gummert et al., 1999a; Barten et al., submitted; Klupp et al., submitted-b) und im Rahmen einer klinischen Phase I Studie (van Gelder et al., in preparation) angewendet. Eine andere Form des pharmakodynamischen Monitorings der MMF Aktivität besteht in der Analyse der IMPDH Inhibition (Langman et al., 1996; Langman et al., 1997; Brunet et al., 2000; Budde et al., 2000). Diese korrelierte mit der MPA-Plasmakonzentration in Tiermodellen (Langman et al., 1997), aber auch in klinischen Studien (Langman et al., 1996; Brunet et al., 2000; Budde et al., 2000). Eine Korrelation

zum Auftreten einer Rejektion konnte bisher noch nicht gezeigt werden (Langman et al., 1997). Im Gegensatz dazu, korrelierte das eigene pharmakodynamische Modell hoch mit der Schwere der auftretenden akuten Abstoßungsreaktion im Rattenmodell (Studie 102 und Gummert et al., 1999a; Barten et al., submitted; Klupp et al., submitted-b).

Die *in vitro* durchgeführten pharmakodynamischen Untersuchungen bei den transplantierten Tieren bestätigten die bekannten Wirkungsmechanismen von MMF: Es kam zu einer Inhibition der Lymphozytenproliferation (IC_{50} 0,48 mg/l) und der Reduktion der Expression von verschiedenen Zelloberflächen Antigenen (IC_{50} 0,33 bis > 10 mg/l), die für die Lymphozytenaktivierung (CD71, CD25), interzelluläre Kontakte (CD11a), T Zell Kostimulation (CD154) und Apoptose (CD95) verantwortlich sind (Allison und Eugui, 1993a; Allison et al., 1993; Gummert et al., 1999a; Barten et al., 2001; Klupp et al., 2001c; van Gelder et al., in preparation). Die Expression von Zytokinen (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ) wurde in T Zellen ebenso wenig beeinflusst, wie die Monozyten oder B Zell Aktivierung. Im Gegensatz zu den homogenen pharmakodynamischen Parametern *in vitro* variierten *in vivo* die Parameter erheblich (Tabelle 6).

Für das pharmakodynamische Monitoring wurde alleine die Lymphozytenproliferation verwendet, da sie den zentralen Wirkungsmechanismus von MPA widerspiegelt. Die Parameter für die Lymphozytenaktivierung erreichten nur eine geringe Korrelation mit den MPA-Plasmaspiegel. Es schien als ob nach anfänglicher signifikanter Suppression, die Antigen Expression sich nach 3 Wochen trotz unveränderter MMF Therapie wieder etablierte. Die Proliferation blieb dagegen während des gesamten Verlaufs gehemmt und die Variation war deutlich geringer, als die der MPA-Plasmaspiegel. Eine absolute Proliferationsrate von 5% wurde als Grenzwert für die Dosisanpassung gewählt, da niedrigere Werte nicht mehr von falsch positiven, an Zellen unspezifisch gebundenen Antikörpern zu unterscheiden sind. Insgesamt lag bei 5 von 6 Tieren an 2 bis 6 Therapie-tagen die PCNA-Expression oberhalb des festgesetzten Grenzwertes und führte zur Dosisanpassung.

3. *Effekt der MMF Therapie ab Tag 45 nach Transplantation*

Bis zum Tag 42 waren in den IVUS Untersuchungen die Volumina für das Gefäß, das Lumen und die Intima mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar. Somit kann man davon ausgehen, dass am ersten Therapietag an Tag 45 in beiden Gruppen die identischen Vorbedingungen bestanden, obwohl sich die Tiere in ihrem präoperativen Körpergewicht unterschieden. Auch wenn sich das Gefäßvolumen in der Therapiegruppe zwischen den Tagen 21 und 105 im Gegensatz zur Kontrollgruppe nicht signifikant verringerte, so war doch zu keiner Zeit der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant. Ausgehend von Tag 21 verringerte sich das Volumen des Gefäßlumens im mittleren Drittel in der Kontrollgruppe um 35% und in der Therapiegruppe um 33%. Ebenso war der Unterschied des Blutdruckgradienten am Tag 105 statistisch nicht signifikant.

Der primäre Endpunkt dieser Studie war die Entwicklung der Intimahyperplasie in den IVUS Untersuchungen. An Tag 42, drei Tage vor Therapiebeginn, lag in beiden Gruppen das Intimavolumen bei 25 mm^3 im mittleren Transplantatdrittel. Bis zum Tag 105 stieg in der Kontrollgruppe das Volumen auf $55,2 \pm 2,8 \text{ mm}^3$ und in der Therapiegruppe auf $47,8 \pm 7,2 \text{ mm}^3$ an. Aufgrund der hohen Variabilität in der Therapiegruppe erreichte der Unterschied allerdings nicht Signifikanzniveau. Auch bei der qualitativen histologischen Untersuchung wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt: Während in der Kontrollgruppe in einem Tier eine geringgradige TVP, in zwei Tieren eine mittelgradige und in drei Tieren eine ausgeprägte TVP bestand, kam es in der Therapiegruppe zu einer geringgradigen TVP in zwei Tieren, zu einer mittelgradigen TVP in drei und einer ausgeprägten TVP bei einem Tier.

In der Histomorphometrie wurde der Unterschied in der Intimahyperplasie zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von 0,07 nur knapp verfehlt: Die mittlere Fläche der Intima lag in der Kontrollgruppe bei $4,2 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ und in der MMF Gruppe bei $2,9 \pm 0,5 \text{ mm}^2$. Die Fläche der Media war dagegen in der MMF Gruppe ($1,5 \pm 1,3 \text{ mm}^2$) signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ($2,3 \pm 0,3 \text{ mm}^2$; $p = 0,016$). Jedoch sind diese Ergebnisse aufgrund der vorbeschriebenen postmortalen Schrumpfung der Gefäße nur eingeschränkt zu verwerten und müssen in ihrer Bedeutung der IVUS-Morphometrie als nachgeordnet beurteilt werden.

Im gleichen Modell in einer separaten Studie wurde die Wirksamkeit von Sirolimus bewertet (Ikonen et al., 2000b; Ikonen et al., 2000c). Hier zeigte sich Sirolimus effektiv in der Behandlung der Transplantat-Vaskulopathie: So lag die im IVUS gemessene Intimafläche an Tag 105 in der Kontrollgruppe bei $6,4 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ und in der Therapiegruppe bei $3,7 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ ($p = 0,037$). Auch wenn die Studie im gleichen Labor stattfand, so ist ein direkter Vergleich beider Studienergebnisse nicht möglich, da sich die Methodik in wesentlichen Details unterschied.

4. *Inter-individuelle Unterschiede in der MMF Wirksamkeit*

Die Ergebnisse der Morphometrie zeigten in der MMF Therapiegruppe eine erhebliche Variation auf. Bei genauerer Untersuchung der Intimavolumina zeigte sich, dass in 4 Tieren (Rx1 – Rx4) am Tag 105 nach Transplantation ein geringeres Intimavolumen als in jedem Einzelnen der Kontrolltiere vorlag (Abbildung 56). Im Gegensatz dazu entwickelte sich die Transplantat-Vaskulopathie bei den Tieren Rx5 und Rx6 (in den Abbildungen fett gedruckt) ungehindert. Bei einer Subgruppen-Analyse war somit der Unterschied zwischen den behandelten Tieren Rx1-4 zu der Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,02$).

Die Frage stellte sich, ob dieses Ergebnis ein Phänomen der Zufallsverteilung oder kausal bedingt war. Bei der Untersuchung der Korrelation verschiedener Faktoren mit der Ausprägung der Intimahyperplasie zeigte sich, dass die Höhe des Stimulations-Indexes in der MLR signifikant mit dem Intimavolumen in der MMF Gruppe korrelierte. So wiesen beide als „Non Responder“ bezeichneten Tiere einen SI von mehr als 10 auf (Abbildung 60), während alle anderen Tiere deutlich darunter lagen. Der am auffälligste Zusammenhang zeigte sich jedoch in der MMF-Tolerabilität der Tiere: Aufgrund erhöhter Toxizität mußte bei Rx5 und Rx6 die MMF Dosis zeitweilig deutlich reduziert werden (Abbildung 40) und die mittlere MMF-Dosis/Tag korrelierte hoch mit dem IVUS-Intimavolumen bzw. der Intimafläche gemessen in der Histologie ($r^2 = 0,85 - 0,89$, $p = 0,03 - 0,015$) (Abbildung 61). Auch bei dem Tier Rx4 war der Zusammenhang zwischen MMF-Dosis und sich entwickelnder Intimahyperplasie deutlich: An Tag 63 zeigte dieses Tier noch das zweit niedrigste Intimavolumen von allen 12 untersuchten

Tieren. Nach dem Tag 67 verlor das Tier aufgrund der MMF Unverträglichkeit 6% seines Körpergewichtes (Abbildung 42) und trotz Zufütterung mußte die MMF Dosis an Tag 70 auf 30 mg/kg reduziert werden (Abbildung 40). Als Folge fiel der MPA-Plasmaspiegel von 4,6 mg/l auf 2,2 mg/l ab und die absolute Proliferationsrate stieg von 1,3 auf 4,4% an. Das Intimavolumen betrug an Tag 63 25 mm³ und stieg innerhalb von 3 Wochen auf 39 mm³ an Tag 84 an (Abbildung 56).

Die MPA-Plasma-Talspiegel korrelierten nicht mit dem Ausmaß der Intimahyperplasie. Auch wenn man berücksichtigt, dass anhand dieser Spiegel die Therapie angeglichen wurde, und man die Tage bestimmt an denen die Spiegel den festgesetzten Grenzwert von 2,0 mg/l unterschritten, so kann man keinen Zusammenhang mit dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie erkennen. Gleiches gilt für die Pharmakodynamik: Absolute Lymphozyten-Proliferationsraten und relativ zum unbehandelten Ausgangswert bestimmte Proliferationsraten korrelierten nicht signifikant mit dem Intimavolumen gemessen im IVUS oder der Intimafläche der Histomorphometrie. Berücksichtigt man allerdings die unterschiedliche MMF Sensitivität der Tiere *in vivo* (Tabelle 6) so stellt sich ein Zusammenhang der Pharmakodynamik mit dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie dar: Die Anzahl der Tage, bei denen die Inhibition der Lymphozytenproliferation nicht zumindest zu 95% des theoretischen Minimums (E_{\min}) erreicht wurde, korrelierte signifikant mit dem im IVUS ermittelten Intimavolumen ($r^2 = 0,82$, $p=0,046$).

D. Schlußfolgerungen

Auch wenn MMF in dieser Studie die Intimahyperplasie im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht signifikant verminderte, so konnte man doch einen deutlichen Einfluss der MMF Therapie auf die Transplantat-Vaskulopathie erkennen. In Abhängigkeit von der MMF Verträglichkeit entwickelte sich die Intimahyperplasie, und die im IVUS gemessenen Volumina korrelierten signifikant mit der mittleren MMF-Tagesdosis. Nach ausführlichen Vorbereitungen wurde MMF in Cynomolgus Affen in seiner maximal tolerierten Dosis (MTD) verabreicht und es ist zweifelhaft, ob eine weitere Dosis-Steigerung in dieser Spezies möglich wäre. Dabei handelte es sich um ein Tiermodell, das eine fortgeschrittene chronische Rejektion simuliert. Zum Zeitpunkt als mit der Therapie begonnen wurde, war die Intimahyperplasie bereits etabliert und ein angelaufener Immunprozeß mußte gestoppt werden. Wie wichtig der Zeitpunkt des Therapiebeginns ist, zeigten die hier vorgestellten Studien (Gregory et al., 1995; Hullett et al., 1996; Sousa et al., 2000). Aber auch in einem Modell, das unabhängig von der Immunsuppression ist (Tullius et al., 1994) zeigte sich, dass ab einem gewissen Zeitpunkt der Prozeß der chronischen Rejektion unabhängig vom allogenen Stimulus progredient fortschreitet. Es ist unwahrscheinlich, dass in der eigenen Studie dieser Zeitpunkt schon erreicht worden war. Zum einen zeigte sich Sirolimus in diesem Modell als wirksam (Ikonen et al., 2000b; Ikonen et al., 2000c) und zum anderen dominierte in der Histologie am Ende des Versuchs noch die glatte Muskelzellproliferation über den bereits eingeleiteten, fibroblastischen Umbau. Die Korrelation der MMF Dosis mit dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie, sowie die Wirksamkeit in vielen Rattenmodellen (O'Hair et al., 1994; Azuma et al., 1995; Fraser-Smith et al., 1995; Gregory et al., 1995; Raisanen-Sokolowski et al., 1995b; Hullett et al., 1996) lässt den Schluß zu, dass MMF zumindest in der Prävention der Transplantat-Vaskulopathie wirksam ist. Interessant wäre der Verlauf in diesem Experiment, wenn mit der MMF Therapie zum Zeitpunkt der Transplantation begonnen würde. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die aus den Rattenexperimenten synergistische Wirkung von MMF und Sirolimus (Gregory et al., 1995) sich auch in diesem Primaten-Modell nachweisen läßt. Demnach wäre zu prüfen, ob die Kombination

von Sirolimus und MMF bei einem Therapiebeginn am Tag 45 in diesem Experiment einen Vorteil gegenüber der Sirolimus Monotherapie bringen würde.

Insgesamt sind die tierexperimentellen Daten ermutigend, den Wert von MMF in der Therapie und Prophylaxe der chronischen Rejektion in klinischen Studien weiter zu prüfen. Die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien sind uneinheitlich und beziehen sich nur auf einzelne Fallberichte. Hierbei wurde gezeigt, dass MMF wirksam in der Behandlung der chronischen Rejektion nach Nieren- (Campistol et al., 1999; Di et al., 2000; Ferraris et al., 2000) und Lebertransplantation (Klupp et al., 1997; Kato et al., 1999) sein kann. Andere Publikationen zeigten jedoch keinen (Glicklich et al., 1998) oder nur einen geringen funktionellen Vorteil (Jirasiritham et al., 1998) für die MMF Therapie. Auch wenn eine lange Nachbeobachtungszeit und aufgrund der Inzidenz ein Multicenter-Design notwendig ist, so müssen heute jedoch randomisierte, prospektive Studien gefordert werden, um die Wirksamkeit von MMF zur Behandlung oder Therapie von chronischen Rejektionen prüfen zu können. Wie in dieser Studie gezeigt, ist es unter Umständen möglich, mit pharmakokinetischen und insbesondere mit pharmakodynamischen Messungen Patientengruppen zu identifizieren, die hierbei von einer MMF Therapie besonders profitieren könnten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Heute hat sich die Transplantation als Therapiekonzept bei den verschiedensten Organversagen durchgesetzt. Die perioperative Morbidität und Mortalität sind auf ein Minimum gesunken, akute Abstoßungsepisoden sind in aller Regel vermeidbar oder gut beherrschbar und führen nur noch selten zu einem Transplantatverlust. Mit immer besser werdenden Kurzzeitergebnissen nach Organtransplantation rückt das chronische Transplantatversagen und die immer noch unbefriedigende Langzeitfunktion in den Mittelpunkt des Interesses. Die chronische Rejektion ist hierbei die Hauptursache für das alloantigen abhängige Organversagen im späteren Verlauf nach Transplantation. Ein Hauptmerkmal der chronischen Rejektion ist die Transplantat-Vaskulopathie. Durch eine konzentrische Intimahyperplasie in den Arterien und Arteriolen des Transplantates, hervorgerufen durch eine Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten, kommt es zu einer Minderperfusion des Organs und letztendlich zu einem chronisch fortschreitenden Transplantatversagen.

Mycophenolat Mofetil (MMF) ist als Immunsuppressivum in der Lage akute Abstoßungsreaktion zu verhindern und wird klinisch in Kombinationen mit anderen Medikamenten nach Nieren-, Leber-, Pankreas- und Herz-Transplantation eingesetzt. Neben seiner Eigenschaft die Lymphozytenproliferation zu hemmen, zeigt MMF auch eine antiproliferative Wirksamkeit auf glatte Muskelzellen, die eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der chronischen Rejektion spielen. In einigen Tierexperimenten konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass MMF die Entwicklung der Intimaproliferation hemmen kann. In der hier vorgestellten Studie wurde nun der Effekt von MMF auf eine fortgeschrittene, bereits etablierte Transplantat-Vaskulopathie im Primatenmodell geprüft.

Nachdem in mehreren Vorstudien die Dosis, das Dosierungsintervall und der Applikationsweg getestet wurde, konnte MMF in einer maximal tolerierten Dosis den Cynomolgus Affen verabreicht werden. Diese Tiere dienten jeweils als Spender und Empfänger eines 3 cm langen, infrarenalen Aortensegmentes. Um sicher zu stellen, dass sich eine Transplantat-Vaskulopathie etablieren konnte, erhielten die Tiere in den ersten 6 Wochen nach Transplantation keinerlei Immunsuppression. Erst ab Tag 45 wurde mit der

MMF Therapie begonnen. Die Entwicklung der Intimahyperplasie wurde mit intravaskulären Ultraschalluntersuchungen dokumentiert und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Während sich in der Kontrollgruppe die Intimahyperplasie ungebremsst entwickelte, kam es in der Therapiegruppe zu einer Verlangsamung des Intimawachstums. Auch wenn der Unterschied zwischen den Gruppen am Versuchsende nicht signifikant war, so zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der verabreichten MMF Dosis und der sich entwickelten Transplantat-Vaskulopathie: Tiere, welche die MMF Therapie gut tolerierten, zeigten eine signifikant geringer Intimahyperplasie als Tiere der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, bei denen die MMF Dosis aufgrund von Nebenwirkungen reduziert werden mußte, entwickelte sich die Intimaprolieration ungehindert. Ferner konnte gezeigt werden, dass pharmakodynamische Messungen, welche die unterschiedlichen Medikamenten Sensibilität der Tiere widerspiegeln, ebenfalls mit der Transplantat-Vaskulopathie korrelierten.

Zusammengefaßt zeigen diese Untersuchungen, dass MMF auch im Primatenmodell einen Einfluss auf die Transplantat-Vaskulopathie besitzt. Ob diese Wirksamkeit allerdings ausreichen wird fortgeschrittene chronische Rejektionen zumindest zu einem Stillstand zu bringen oder zu heilen, bleibt abzuwarten. Zu prüfen ist, ob MMF in diesem vorgestellten Modell in der Lage ist, die Entwicklung der Intimahyperplasie zu verhindern, wenn es schon ab dem ersten Tag nach Transplantation gegeben wird. Auch stellt sich die Frage, ob und mit welchen anderen Medikamenten (z.B. Sirolimus) ein synergistischer Effekt bei der Behandlung der Transplantat-Vaskulopathie besteht. Letztendlich werden klinische Studien den Stellenwert von MMF in der Behandlung der chronischen Rejektion prüfen müssen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ALLISON AC UND EUGUI EM (1993a) Immunosuppressive and other Effects of Mycophenolic Acid and an Ester Prodrug, Mycophenolate Mofetil. *Immunol Rev* **136**: 5-28.
- ALLISON AC UND EUGUI EM (1993b) Mycophenolate mofetil, a rational designed immunosuppressive drug. *Clin Transplantation* **7**: 96-112.
- ALLISON AC UND EUGUI EM (1994) Preferential suppression of lymphocyte proliferation by mycophenolic acid and predicted long-term effects of mycophenolate mofetil in transplantation. *Transplant Proc* **26**: 3205-3210.
- ALLISON AC, EUGUI EM UND SOLLINGER HW (1993) Mycophenolate Mofetil (RS-61443): Mechanisms of Action and Effects in Transplantation. *Transplant Rev* **7**: 129-139.
- AZUMA H, BINDER J, HEEMANN U, SCHMID C, TULLIUS SG UND TILNEY NL (1995) Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* **59**: 460-466.
- BANDO H, MITANI H, NIIHASHI M, KUSUMI Y, ISHIKAWA J, KIMURA M, TOTSUKA T, SAKURAI I UND HAYASHI S (1996) Inhibitory effect of fluvastatin at doses insufficient to lower serum lipids on the catheter-induced thickening of intima in rabbit femoral artery. *Eur J Pharmacol* **315**: 37-42.
- BARNARD C (1967) The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J* **41**: 1271-1274.
- BARTEN MJ, GUMMERT JF, VAN GELDER T, SHORTHOUSE R UND MORRIS RE (2001) Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods* **253**: 95-112.
- BARTEN MJ, VAN GELDER T, GUMMERT JF, BOEKE K, SHORTHOUSE R, BILLINGHAM M UND MORRIS RE (submitted) Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil (CellCept) after heart transplantation: New mechanism of action and correlation with histologic severity of graft rejection. *Am J Transpl*.

-
- BATTS KP (1999) Acute and chronic hepatic allograft rejection: pathology and classification. *Liver Transpl Surg* **5**: S21-29.
- BECHSTEIN WO, SCHILLING M, STEELE DM, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1993) RS-61443/cyclosporine combination therapy prolongs canine liver allograft survival. *Transplant Proc* **25**: 702-703.
- BELZER FO, ASHBY BS UND DUNPHY JE (1967) 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* **2**: 536.
- BILLINGHAM ME (1994) Pathology and etiology of chronic rejection of the heart. *Clin Transplant* **8**: 289-292.
- BILLINGHAM ME, CARY NR, HAMMOND ME, KEMNITZ J, MARBOE C, MCCALLISTER HA, SNOVAR DC, WINTERS GL UND ZERBE A (1990) A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant* **9**: 587-593.
- BLINDT R, BOSSERHOFF AK, ZEIFFER U, KROTT N, HANRATH P UND VOM DAHL J (2000) Abciximab inhibits the migration and invasion potential of human coronary artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 2195-2206.
- BOREL J, FEURER C, GUBLER H UND STAHELIN H (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**: 468-475.
- BRETTSCHEIDER L, KOLFF J, SMITH G, MARTIN A, TAYLOR P UND STARZL T (1968) An evaluation of perfusion constituents in liver preservation. *Surg Forum* **19**: 354-356.
- BREWSTER TB, COLE MP, JONES CT, PLATT DS UND TODD ID (1972) Mycophenolic acid (NSC-129 185): preliminary clinical trials. *Cancer Chemother Rep* **56**: 83-87.
- BRUNET M, MARTORELL J, OPPENHEIMER F, VILARDELL J, MILLAN O, CARRILLO M, ROJO I UND CORBELLÀ J (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in stable renal transplant recipients treated with low doses of mycophenolate mofetil. *Transpl Int* **13**: S301-305.

-
- BUDDE K, GLANDER P, BAUER S, BRAUN K, WAISER J, FRITSCH L, MAI I, ROOTS I UND NEUMAYER HH (2000) Pharmacodynamic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin Chem Lab Med* **38**: 1213-1216.
- BULLINGHAM R, MONROE S, NICHOLLS A UND HALE M (1996a) Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* **36**: 315-324.
- BULLINGHAM RE, NICHOLLS A UND HALE M (1996b) Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant Proc* **28**: 925-929.
- BULLINGHAM RE, NICHOLLS AJ UND KAMM BR (1998) Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* **34**: 429-455.
- CALNE R, WHITE D, ROLLES K, SMITH D UND HERBERTSON B (1978a) Prolonged survival of pig orthotopic heart grafts treated with cyclosporin A. *Lancet* **1**: 1183-1185.
- CALNE R, WHITE D, THIRU S, EVANS D, MCMASTER P, DUNN D, CRADDOCK G, PENTLOW B UND ROLLES K (1978b) Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* **2**: 1323-1327.
- CAMPISTOL J, MAZUECOS A, SEGURA J, OSUNA A, HERRERO J, ANDRES A, OPPENHEIMER F, GOMEZ DLCA, MARTINEZ M UND MORALES J (1999) Mycophenolate mofetil slows the decline of renal function in patients with biopsy-proven chronic rejection: a collaborative pilot study. *Transplant Proc* **31**: 2267-2269.
- CARREL A (1914) The transplantation of organs. *N Y Med* **99**: 839-846.
- CHAPMAN FA, CRAMER DV UND MAKOWKA LS (1994) Heterotopic Heart Transplantation in Rodents, in *Handbook of Animal Models in Transplantation Research* (Cramer DV, Podesta L und Makowka LS eds) 149-160, CRC Press Inc., Boca Raton.
- CHELLMAN GJ, LUKAS VS, EUGUI EM, ALTERA KP, ALMQUIST SJ UND HILLIARD JK (1992) Activation of B virus (*Herpesvirus simiae*) in chronically immunosuppressed cynomolgus monkeys. *Lab Anim Sci* **42**: 146-151.

- CORSINI A, BERNINI F, QUARATO P, DONETTI E, BELLOSTA S, FUMAGALLI R, PAOLETTI R UND SOMA VM (1996) Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* **87**: 458-468.
- CORSINI A, RAITERI M, SOMA MR, BERNINI F, FUMAGALLI R UND PAOLETTI R (1995) Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Cardiol* **76**: 21A-28A.
- COSTANZO MR, NAFTEL DC, PRITZKER MR, HEILMAN JK, 3RD, BOEHMER JP, BROZENA SC, DEC GW, VENTURA HO, KIRKLIN JK, BOURGE RC UND MILLER LW (1998) Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac Transplant Research Database. *J Heart Lung Transplant* **17**: 744-753.
- DAL BELLO B, KLERSY C, GROSSI P, GAVAZZI A, IPPOLITI G, RINALDI M, VIGANO M UND ARBUSTINI E (1998) Combined human cytomegalovirus and hepatitis C virus infections increase the risk of allograft vascular disease in heart transplant recipients. *Transplant Proc* **30**: 2086-2090.
- D'ALESSANDRO A, RANKIN M, MCVEY J, HAFEZ G, SOLLINGER H, KALAYOGLU M UND BELZER F (1993) Prolongation of canine intestinal allograft survival with RS-61443, cyclosporine, and prednisone. *Transplantation* **55**: 695-701.
- DAUSSET J (1958) Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* **20**: 156-166.
- DEMETRIS A, ADAMS D, BELLAMY C, BLAKOLMER K, CLOUSTON A, DHILLON AP, FUNG J, GOUW A, GUSTAFSSON B, HAGA H, HARRISON D, HART J, HUBSCHER S, JAFFE R, KHETTRY U, LASSMAN C, LEWIN K, MARTINEZ O, NAKAZAWA Y, NEIL D, PAPPO O, PARIZHSKAYA M, RANDHAWA P, RASOUL-ROCKENSCHAUB S, REINHOLT F, REYNES M, ROBERT M, TSAMANDAS A, WANLESS I, WIESNER R, WERNERSON A, WRBA F, WYATT J UND YAMABE H (2000) Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* **31**: 792-799.
- DI ML, BERTONI E, ROSATI A, ZANAZZI M, PIPERNO R, MOSCARELLI L, TOTI G, CASINI F, BANDINI S UND SALVADORI M (2000) Mycophenolate mofetil (MMF) in the treatment of chronic renal rejection. *Clin Nephrol* **53**: 33-34.

- ECKHOFF D, MCGUIRE B, FRENETTE L, CONTRERAS J, HUDSON S UND BYNON J (1998) Tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil combination therapy versus tacrolimus in adult liver transplantation. *Transplantation* **65**: 180-187.
- EPINETTE WW, PARKER CM, JONES EL UND GREIST MC (1987) Mycophenolic acid for psoriasis. *J Amer Acad Dermatol* **17**: 962-971.
- EUGUI E (2001) persönliche Kommunikation; interne Untersuchungsergebnisse Roche, Bioscience, Palo Alto, CA, USA.
- EUGUI E, ALMQUIST S, MULLER C UND ALLISON A (1991) Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* **33**: 161-173.
- EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP (1995) Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* **345**: 1321-1325.
- FELLSTROM B, BACKMAN U, LARSSON E UND ZEZINA L (1999) Immunologic and nonimmunologic risk factors of chronic rejection. *Transplant Proc* **31**: 1304-1305.
- FERRARIS J, TAMBUTTI M, REDAL M, BUSTOS D, RAMIREZ J UND PRIGOSHIN N (2000) Conversion from azathioprine [correction of azathioprina] to mycophenolate mofetil in pediatric renal transplant recipients with chronic rejection. *Transplantation* **70**: 297-301.
- FOEGH ML, ASOTRA S, HOWELL MH UND RAMWELL PW (1994) Estradiol inhibition of arterial neointimal hyperplasia after balloon injury. *J Vasc Surg* **19**: 722-726.
- FRASER-SMITH E, ROSETE J UND SCHATZMAN R (1995) Suppression by mycophenolate mofetil of the neointimal thickening caused by vascular injury in a rat arterial stenosis model. *J Pharmacol Exp Ther* **275**: 1204-1208.
- GIBSON T UND MEDAWAR PB (1942) Fate of skin homografts in man. *J Anatom* **77**: 29-57.
- GLANEMANN M, KLUPP J, LANGREHR J, PLATZ K, SCHROER G, RAAKOW R, STANGE B, SETTMACHER U, BECHSTEIN W UND NEUHAUS P (2001) Mycophenolate mofetil is superior in combination with tacrolimus compared to cyclosporine for immunosuppressive therapy after liver transplantation [In Process Citation]. *Transplant Proc* **33**: 1069-1070.

- GLANEMANN M, KLUPP J, LANGREHR J, SCHROER G, PLATZ K, STANGE B, SETTMACHER U, BECHSTEIN W UND NEUHAUS P (2000) Higher immunosuppressive efficacy of mycophenolate mofetil in combination with FK 506 than in combination with cyclosporine A. *Transplant Proc* **32**: 522-523.
- GLICKLICH D, GUPTA B, SCHURTER-FREY G, GREENSTEIN S, SCHECHNER R UND TELLIS V (1998) Chronic renal allograft rejection: no response to mycophenolate mofetil. *Transplantation* **66**: 398-399.
- GOSIO B (1896) Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Rivista d'Igiene e Sanita Publica Ann* **7**: 825-868.
- GREGORY C, HUANG X, PRATT R, DZAU V, SHORTHOUSE R, BILLINGHAM M UND MORRIS R (1995) Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* **59**: 655-661.
- GREGORY CR, HUIE P, BILLINGHAM ME UND MORRIS RE (1993a) Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* **55**: 1409-1418.
- GREGORY CR, PRATT RE, HUIE P, SHORTHOUSE R, DZAU VJ, BILLINGHAM ME UND MORRIS RE (1993b) Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc* **25**: 770-771.
- GRUESSNER R, SUTHERLAND D, DRANGSTVEIT M, WRENSHALL L, HUMAR A UND GRUESSNER A (1998) Mycophenolate mofetil in pancreas transplantation. *Transplantation* **66**: 318-323.
- GUMMERT J, IKONEN T, BRIFFA N, HONDA Y, HAYASE M, PERLROTH J, KOBAYASHI Y, HAUSEN B, BARLOW C, BILLINGHAM M, FITZGERALD P, YOCK P, ROBBINS R UND MORRIS R (1998) A new large-animal model for research of graft vascular disease. *Transplant Proc* **30**: 4023.

- GUMMERT JF, BARTEN MJ, SHERWOOD SW, VAN GELDER T UND MORRIS RE (1999a) Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: Inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1100-1112.
- GUMMERT JF, CHRISTIANS U, BARTEN M, SILVA H UND MORRIS RE (1999b) High-performance liquid chromatographic assay with a simple extraction procedure for sensitive quantification of mycophenolic acid in rat and human plasma. *J Chromat B* **721**: 321-326.
- HAGER PW, COLLART FR, HUBERMAN E UND MITCHELL BS (1995) Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding. *Biochem Pharmacol* **49**: 1323-1329.
- HAMBURGER J, VAYESSE I UND CROSNIER J (1959) Transplantation of a kidney between non-monozygotic twins after irradiation of the recipient. *Presse Med* **67**: 1771-1775.
- HAMILTON D UND REID W (1984) Yu Yu Voronoy and the first human kidney allograft. *Surg Gynecol Obstet* **159**: 289-294.
- HAUSEN B, BOEKE K, BERRY GJ UND MORRIS RE (2001) Viral Serine Proteinase Inhibitor (Serp-1) Effectively Decreases the Incidence of Graft Vasculopathy in Heterotopic Heart Allografts1. *Transplantation* **72**: 364-368.
- HAYRY P (1998) Chronic allograft vasculopathy: new strategies for drug development. *Transplant Proc* **30**: 3989-3990.
- HAYRY P, MENNANDER A, THIALA S, HALTTUNEN J, YILMAZ S UND PAAVONEN T (1991) Rat aortic allografts: an experimental model for chronic transplant arteriosclerosis. *Transplant Proc* **23**: 611-612.
- HEBERT M, ASCHER N, LAKE J, EMOND J, NIKOLAI B, LINNA T UND ROBERTS J (1999) Four-year follow-up of mycophenolate mofetil for graft rescue in liver allograft recipients. *Transplantation* **67**: 707-712.
- HULLETT DA, GERAGHTY JG, STOLTENBERG RL UND SOLLINGER HW (1996) The impact of acute rejection on the development of intimal hyperplasia associated with chronic rejection. *Transplantation* **62**: 1842-1846.

- HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1993) Mycophenolate mofetil and brequinar sodium: new immunosuppressive agents. *Transplant Proc* **25**: 45-47.
- IKONEN T, BRIFFA N, GUMMERT J, HONDA Y, HAYASE M, HAUSEN B, BILLINGHAM M, YOCK P, ROBBINS R UND MORRIS R (2000a) Multidimensional assessment of graft vascular disease (GVD) in aortic grafts by serial intravascular ultrasound in rhesus monkeys. *Transplantation* **70**: 420-429.
- IKONEN T, GUMMERT J, HAYASE M, HONDA Y, HAUSEN B, CHRISTIANS U, BERRY G, YOCK P UND MORRIS R (2000b) Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* **70**: 969-975.
- IKONEN T, GUMMERT J, HONDA Y, HAYASE M, PERLROTH J, HAUSEN B, BARLOW C, FITZGERALD P, YOCK P UND MORRIS R (1999) Development of models of graft vascular disease in nonhuman primates: evaluation of GVD by intravascular ultrasound in a new cynomolgus model with arterial allograft exchange. *Transplant Proc* **31**: 687.
- IKONEN T, GUMMERT J, SERKOVA N, HAYASE M, HONDA Y, KOBAYASE Y, HAUSEN B, YOCK P, CHRISTIANS U UND MORRIS R (2000c) Efficacies of sirolimus (rapamycin) and cyclosporine in allograft vascular disease in non-human primates: trough levels of sirolimus correlate with inhibition of progression of arterial intimal thickening. *Transpl Int* **13 Suppl 1**: S314-320.
- ISOBE M, SUZUKI J, MORISHITA R, KANEDA Y UND AMANO J (2000) Gene therapy for heart transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **902**: 77-83.
- JAIN A, HAMAD I, RAKELA J, DODSON F, KRAMER D, DEMETRIS J, MCMICHAEL J, STARZL T UND FUNG J (1998) A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone, and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplant recipients: an interim report. *Transplantation* **66**: 1395-1398.
- JAIN A, REYES J, KASHYAP R, DODSON S, DEMETRIS A, RUPPERT K, ABU-ELMAGD K, MARSH W, MADARIAGA J, MAZARIEGOS G, GELLER D, BONHAM C, GAYOWSKI T, CACCIARELLI T, FONTES P, STARZL T UND FUNG J (2000) Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg* **232**: 490-500.

- JAIN A, VENKATARAMANAN R, HAMAD IS, ZUCKERMAN S, ZHANG S, LEVER J, WARTY VS UND FUNG JJ (2001) Pharmacokinetics of mycophenolic acid after mycophenolate mofetil administration in liver transplant patients treated with tacrolimus. *J Clin Pharmacol* **41**: 268-276.
- JIRASIRITHAM S, SUMETHKUL V, MAVICHAK V, CHIEWSILP P, LEENANUPUNTH C UND KOCHAKARN W (1998) Treatment of chronic rejection in renal transplantation by mycophenolate mofetil (MMF): a preliminary report of six-month experience. *Transplant Proc* **30**: 3576-3577.
- KAHAN BD (1983) Cosmas and Damian revisited. *Transplant Proc* **15**: 2211-2216.
- KAHAN BD (1988) Pien Ch'iao, the legendary exchange of hearts: traditional Chinese medicine and the modern area of cyclosporine. *Transplant Proc* **20**: 3-12.
- KAHL A, BECHSTEIN W, LORENZ F, STEINBERG J, POHLE C, KAMPF D, MULLER A, SETTMACHER U, NEUHAUS P UND FREI U (2001) Long-term prednisolone withdrawal after pancreas and kidney transplantation in patients treated with ATG, tacrolimus, and mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* **33**: 1694-1695.
- KATO T, RUIZ P, DE FW, WEPPLER D, KHAN F, PINNA A, NERY J UND TZAKIS A (1999) Mycophenolate mofetil rescue therapy in patients with chronic hepatic allograft rejection. *Transplant Proc* **31**: 396.
- KIRKLIN JK, BOURGE RC, NAFTEL DC, MORROW WR, DEIERHOI MH, KAUFFMAN RS, WHITE WILLIAMS C, NOMBERG RI, HOLMAN WL UND SMITH DCJ (1994) Treatment of recurrent heart rejection with mycophenolate mofetil (RS-61443): initial clinical experience. *J Heart Lung Transplant* **13**: 444-450.
- KLUPP J, BECHSTEIN W, PLATZ K, KECK H, LEMMENS H, KNOOP M, LANGREHR J, NEUHAUS R, PRATSCHKE J UND NEUHAUS P (1997) Mycophenolate mofetil added to immunosuppression after liver transplantation--first results. *Transpl Int* **10**: 223-228.
- KLUPP J, DAMBRIN C, REGIELI J, VAN GELDER T, SHORTHOUSE R UND MORRIS RE (2001A) New approach in drug development: whole blood pharmacodynamic assays reflect biological activities of tacrolimus. *Transplant Proc* **33**: 2172.

- KLUPP J, DAMBRIN C, VAN GELDER T, REGIELI J UND MORRIS RE (submitted-a) Flow cytometric quantitation of immunosuppressive drug effects on T, B cell and monocyte function. Am J Transpl : submitted.
- KLUPP J, GLANEMANN M, BECHSTEIN W, PLATZ K, LANGREHR J, KECK H, SETTMACHER U, RADTKE C, NEUHAUS R UND NEUHAUS P (1999) Mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus versus Neoral after liver transplantation. Transplant Proc **31**: 1113-1114.
- KLUPP J, VAN GELDER T, DAMBRIN C, BOEKE K, REGIELI J, BILLINGHAM ME UND MORRIS RE (2001b) Novel pharmacodynamic assays of lymphocyte function and proliferation in peripheral blood are affected by MMF dose schedule and correlate with histological severity of rejection in rat heart transplant recipients [abstract]. Am J of Transpl **1**:222.
- KLUPP J, VAN GELDER T, DAMBRIN C, REGIELI J, BOEKE K, BILLINGHAM ME UND MORRIS RE (2001c) Mycophenolate mofetil pharmacodynamics and pharmacokinetics correlate with rejection score in a BN-to-LEW heterotopic heart transplant model. Transplant Proc **33**: 2170-2171.
- KLUPP J, VAN GELDER T, DAMBRIN C, REGIELI J, BOEKE K, BILLINGHAM ME UND MORRIS RE (submitted-b) Sustained suppression of peripheral blood immune functions by treatment with mycophenolate mofetil throughout the dosing interval correlates with reduced histologic severity of heart allograft rejection. J Heart Lung Transplant : submitted.
- KLUPP J, VAN GELDER T, REGIELI J, SHORTHOUSE R, KAVANAU K UND MORRIS RE (2000) Development of a novel pharmacodynamic assay in non-human primates. Transplantation **69**: S124.
- KOBASHIGAWA J (1998) Mycophenolate mofetil in cardiac transplantation. Curr Opin Cardiol **13**: p117-121.
- KOBASHIGAWA J, MILLER L, RENLUND D, MENTZER R, ALDERMAN E, BOURGE R, COSTANZO M, EISEN H, DUREAU G, RATKOVEC R, HUMMEL M, IPE D, JOHNSON J, KEOGH A, MAMELOK R, MANCINI D, SMART F UND VALANTINE H (1998) A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Mycophenolate Mofetil Investigators. Transplantation **66**: 507-515.

- KÜSS R, LEGRAIN M, MATHE G, NEDEY R UND CAMEY M (1962) Homologous human kidney transplantation. Experience with six patients. *Postgrad Med J* **38**: 528-531.
- LANDSTEINER L (1931) ABO red blood group system. *Science* **73**: 403-409.
- LANGMAN LJ, LEGATT DF, HALLORAN PF UND YATSCOFF RW (1996) Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* **62**: 666-672.
- LANGMAN LJ, NAKAKURA H, THLIVERIS JA, LEGATT DF UND YATSCOFF RW (1997) Pharmacodynamic monitoring of mycophenolic acid in rabbit heterotopic heart transplant model. *Ther Drug Monit* **19**: 146-152.
- LARSEN RL, APPEGATE PM, DYAR DA, RIBEIRO PA, FRITZSCHE SD, MULLA NF, SHIRALI GS, KUHN MA, CHINNOCK RE UND SHAH PM (1998) Dobutamine stress echocardiography for assessing coronary artery disease after transplantation in children. *J Am Coll Cardiol* **32**: 515-520.
- LITTLE DM, STOLTENBERG RL, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1996) Effect of Neoral or cyclosporine on the development of chronic rejection in an aortic allograft rat model. *Transplant Proc* **28**: 880-881.
- LUCAS A, DAI E, LIU L, GUAN H, NASH P, MCFADDEN G UND MILLER L (2000) Transplant vasculopathy: viral anti-inflammatory serpin regulation of atherogenesis. *J Heart Lung Transplant* **19**: 1029-1038.
- MCDIARMID S (1996) Mycophenolate mofetil in liver transplantation. *Clin Transplant* **10**: 140-145.
- MEDAWAR PB (1944) The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anatom* **78**: 176-196.
- MEISER BM, PFEIFFER M, SCHMIDT D, REICHENSPURNER H, UEBERFUHR P, PAULUS D, VON SCHEIDT W, KREUZER E, SEIDEL D UND REICHART B (1999) Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring. *J Heart Lung Transplant* **18**: 143-149.

- MENNANDER A, TIISALA S, HALTTUNEN J, YILMAZ S, PAAVONEN T UND HAYRY P (1991) Chronic rejection in rat aortic allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb* **11**: 671-680.
- MERION R, HENRY M, MELZER J, SOLLINGER H, SUTHERLAND D UND TAYLOR R (2000) Randomized, prospective trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute renal allograft rejection after simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* **70**: 105-111.
- MERRILL JP, MURRAY JE UND HARRISON JH (1960) Successful homotransplantation of the kidney between non-identical twins. *N Engl J Med* **262**: 1251.
- MOHACSI P, TULLER D, HULLIGER B UND WIJNGAARD P (1997) Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* **16**: 484-492.
- MOON JI, KIM YS, KIM MS, KIM EH, KIM HJ, KIM SI UND PARK K (2000) Effect of cyclosporine, mycophenolic acid, and rapamycin on the proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells: in vitro study. *Transplant Proc* **32**: 2026-2027.
- MORISHITA R, AOKI M UND KANEDA Y (2000) Oligonucleotide-based gene therapy for cardiovascular disease: are oligonucleotide therapeutics novel cardiovascular drugs? *Curr Drug Targets* **1**: 15-23.
- MORRIS R, WANG J, BLUM J, FLAVIN T, MURPHY M, ALMQUIST S, CHU N, TAM Y, KALOOSTIAN M, ALLISON A UND ET A (1991) Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* **23**: 19-25.
- MORRIS RE (2001) Persönliche Kommunikation, in.
- MORRIS RE, HOYT EG, EUGUI EM UND ALLISON AC (1989) Prolongation of rat heart allograft survival by RS-61443. *Surg Forum* **40**: 337-338.

- MORRIS RE, HOYT EG, MURPHY MP, EUGUI EM UND ALLISON AC (1990) Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* **22**: 1659.
- MORRIS RE, HUANG X, GREGORY CR, BILLINGHAM ME, ROWAN R, SHORTHOUSE R UND BERRY GJ (1995) Studies in experimental models of chronic rejection: use of rapamycin (sirolimus) and isoxazole derivatives (leflunomide and its analogue) for the suppression of graft vascular disease and obliterative bronchiolitis. *Transplant Proc* **27**: 2068-2069.
- MORRIS RE UND WANG J (1991) Comparison of the immunosuppressive effects of mycophenolic acid and the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in recipients of heart allografts. *Transplant Proc* **23**: 493-496.
- MURRAY JE, MERRILL JP, DAMMIN GJ UND HARRISON JH (1960) Study of transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigations. *Surgery* **48**: 272.
- MURRAY JE, MERRILL JP UND HARRISON JH (1955) Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* **6**: 432.
- NEGRE-AMINOU P, VAN VLIET AK, VAN ERCK M, VAN THIEL GC, VAN LEEUWEN RE UND COHEN LH (1997) Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG- CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta* **1345**: 259-268.
- NICHOLLS AJ (1998) Opportunities for therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose in renal transplantation suggested by the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for mycophenolic acid and suppression of rejection. *Clin Biochem* **31**: 329-333.
- ODORICO J, LEVERSON G, BECKER Y, PIRSCH J, KNECHTLE S, D'ALESSANDRO A UND SOLLINGER H (1999) Pancreas transplantation at the University of Wisconsin. *Clin Transpl* : 199-210.
- ODORICO J, PIRSCH J, KNECHTLE S, D'ALESSANDRO A UND SOLLINGER H (1998) A study comparing mycophenolate mofetil to azathioprine in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* **66**: 1751-1759.

- O'FLAHERTY WD (1975) Hindu Myths Translated. Penguin Books Ltd., London.
- O'HAIR DP, MCMANUS RP UND KOMOROWSKI R (1994) Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil. *Ann Thorac Surg* **58**: 1311-1315.
- ONO K UND LINDSEY ES (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thoracic Cardiovasc Surg* **57**: 225-229.
- ORBAEK AH (1999) Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts. *Atherosclerosis* **142**: 243-263.
- PAHL E, MILLER SA, GRIFFITH BP UND FRICKER FJ (1995) Occult restrictive hemodynamics after pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* **14**: 1109-1115.
- PARDO MF, PANIZO A, LOZANO M, HERREROS J UND MEJIA S (1997) Role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of chronic rejection in human heart transplantation. *Clin Transplant* **11**: 426-431.
- PLATZ KP, BECHSTEIN WO, ECKHOFF DE, SUZUKI Y UND SOLLINGER HW (1991a) RS-61443 reverses acute allograft rejection in dogs. *Surgery* **110**: 736-741.
- PLATZ KP, ECKHOFF DE, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1991b) Prolongation of dog renal allograft survival by RS-61443, a new, potent immunosuppressive agent. *Transplant Proc* **23**: 497-498.
- PLATZ KP, ECKHOFF DE, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1991c) RS-61443 studies: review and proposal. *Transplant Proc* **23**: 33-35.
- PLISSONNIER D, NOCHY D, PONCET P, MANDET C, HINGLAIS N, BARIETY J UND MICHEL JB (1995) Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* **60**: 414-424.
- QI S, CHEN H, XU D UND DALOZE P (1996) Prolongation of pancreas allograft survival by mycophenolate mofetil in the rat. *Transplant Proc* **28**: 932-933.

- RACUSEN LC, SOLEZ K, COLVIN RB, BONSIK SM, CASTRO MC, CAVALLO T, CROKER BP, DEMETRIS AJ, DRACHENBERG CB, FOGO AB, FURNESS P, GABER LW, GIBSON IW, GLOTZ D, GOLDBERG JC, GRANDE J, HALLORAN PF, HANSEN HE, HARTLEY B, HAYRY PJ, HILL CM, HOFFMAN EO, HUNSICKER LG, LINDBLAD AS, YAMAGUCHI Y UND ET AL. (1999) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* **55**: 713-723.
- RAISANEN-SOKOLOWSKI A, AHO P, MYLLARNIEMI M, KALLIO E UND HAYRY P (1995a) Inhibition of early chronic rejection in rat aortic allografts by mycophenolate mofetil (RS61443). *Transplant Proc* **27**: 435.
- RAISANEN-SOKOLOWSKI A, MYLLARNIEMI M UND HAYRY P (1994) Effect of mycophenolate mofetil on allograft arteriosclerosis (chronic rejection). *Transplant Proc* **26**: 3225.
- RAISANEN-SOKOLOWSKI A, VUORISTO P, MYLLARNIEMI M, YILMAZ S, KALLIO E UND HAYRY P (1995b) Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transpl Immunol* **3**: 342-351.
- RICKENBACHER PR, KEMNA MS, PINTO FJ, HUNT SA, ALDERMAN EL, SCHROEDER JS, STINSON EB, POPP RL, CHEN I, REAVEN G UND VALANTINE HA (1996) Coronary artery intimal thickening in the transplanted heart. An in vivo intracoronary ultrasound study of immunologic and metabolic risk factors. *Transplantation* **61**: 46-53.
- ROSS R (1990) Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Adv Nephrol Necker Hosp* **19**: 79-86.
- ROSS R, GLOMSET J UND HARKER L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* **86**: 675-684.
- SCHMID C, HEEMANN U, AZUMA H UND TILNEY NL (1995) Comparison of rapamycin, RS 61443, cyclosporine, and low-dose heparin as treatment for transplant vasculopathy in a rat model of chronic allograft rejection. *Transplant Proc* **27**: 438-439.
- SCHREIBER T, GREENSTEIN S, KIM D, CALDERON T, SUN S, SCHECHNER R, TELLIS V UND BERMAN J (1998) Effect of mycophenolate mofetil on atherosclerosis in a rabbit model: initial histologic and immunohistochemical analyses. *Transplant Proc* **30**: 961-962.

- SCHÜTZ E, SHIPKOVA M, ARMSTRONG V, WIELAND E UND OELLERICH M (1999) Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* **45**: 419-422.
- SCHWARTZ R UND DAMESHEK W (1959) Drug-induced immunological tolerance. *Nature* **83**: 1682-1683.
- SHAW LM, KORECKA M, DENOFRIO D UND BRAYMAN KL (2001) Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and outcome investigations as the basis for mycophenolic acid therapeutic drug monitoring in renal and heart transplant patients. *Clin Biochem* **34**: 17-22.
- SHAW LM, NICHOLLS A, HALE M, ARMSTRONG VW, OELLERICH M, YATSCOFF R, MORRIS RE, HOLT DW, VENKATARAMANAN R, HALEY J, HALLORAN P, ET'TINGER R, KEOWN P UND MORRIS RG (1998) Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clin Biochem* **31**: 317-322.
- SHIFRINE M, TAYLOR NJ, ROSENBLATT LS UND WILSON FD (1978) Comparison of whole blood and purified canine lymphocytes in a lymphocyte-stimulation microassay. *Am J Vet Res* **39**: 687-690.
- SHUMWAY N, ANGELL W UND WUERFLEIN R (1967a) Progress in transplantation of the heart. *Transplantation* **5**: 900-903.
- SHUMWAY N, ANGELL W UND WUERFLEIN R (1967b) Recent advances in cardiac replacement. *Surgery* **62**: 794-796.
- SIBLEY RK (1994) Morphologic features of chronic rejection in kidney and less commonly transplanted organs. *Clin Transplant* **8**: 293-298.
- SOLEZ K (1994) International standardization of criteria for histologic diagnosis of chronic rejection in renal allografts. *Clin Transplant* **8**: 345-350.
- SOLEZ K, AXELSEN RA, BENEDIKTSSON H, BURDICK JF, COHEN AH, COLVIN RB, CROKER BP, DROZ D, DUNNILL MS, HALLORAN PF UND ET AL. (1993) International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* **44**: 411-422.

- SOLLINGER HW (1995) Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* **60**: 225-232.
- SOLLINGER HW, DEIERHOI MH, BELZER FO, DIETHELM AG UND KAUFFMAN RS (1992) RS-61443 - A phase I clinical trial and pilot rescue study. *Transplantation* **53**: 428-432.
- SOUSA JE, COSTA MA, ABIZAID A, ABIZAID AS, FERES F, PINTO IMF, SEIXAS AC, STAICO R, MATTOS LA, SOUSA AGMR, FALOTICO R, JAEGER J, POPMA JJ UND SERRUYS PW (2000) Lack of Neointimal Proliferation After Implantation of Sirolimus-Coated Stents in Human Coronary Arteries A Quantitative Coronary Angiography and Three-Dimensional Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* **102**: r54-r57.
- STANFORD UNIVERSITY (1999) Administrative Panel on Laboratory Animal Care (A-PLAC); <http://www.stanford.edu/dept/DoR/A-PLAC/>.
- STARZL T, BRETTSCHEIDER L, PENN I, SCHMIDT R, BELL P, KASHIWAGI N, TOWNSEND C UND PUTNAM C (1969) A trial with heterologous antilymphocyte globulin in man. *Transplant Proc* **1**: 448-454.
- STARZL T, MARCHIORO T, PORTER K UND BRETTSCHEIDER L (1967) Homotransplantation of the liver. *Transplantation* **5**: 790-803.
- STEELE D, HULLETT D, BECHSTEIN W, KOWALSKI J, SMITH L, KENNEDY E, ALLISON A UND SOLLINGER H (1993) Effects of immunosuppressive therapy on the rat aortic allograft model. *Transplant Proc* **25**: 754-755.
- STOLTENBERG R, GERAGHTY J, STEELE DM, KENNEDY E, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1994) Cyclosporine inhibits intimal hyperplasia in rat aortic allografts. *Transplant Proc* **26**: 2569-2570.
- STOLTENBERG RL, GERAGHTY J, STEELE DM, KENNEDY E, HULLETT DA UND SOLLINGER HW (1995) Inhibition of intimal hyperplasia in rat aortic allografts with cyclosporine. *Transplantation* **60**: 993-998.
- STRATTA R (1997) Simultaneous use of tacrolimus and mycophenolate mofetil in combined pancreas-kidney transplant recipients: a multi-center report. The FK/MMF Multi-Center Study Group. *Transplant Proc* **29**: 654-655.

- SUZUKI J, ISOBE M, MORISHITA R, NISHIKAWA T, AMANO J UND KANEDA Y (2000) Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res* **45**: 783-787.
- TAYLOR DO, ENSLEY RD, OLSEN SL, DUNN D UND RENLUND DG (1994) Mycophenolate mofetil (RS-61443): preclinical, clinical, and three-year experience in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* **13**: 571-582.
- TULLIUS SG, HANCOCK WW, HEEMANN U, AZUMA H UND TILNEY NL (1994) Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. *Transplantation* **58**: 93-99.
- UNOS (1999) Annual report of the U.S. Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: Transplant Data 1989-1998; http://www.unos.org/data/anrpt_main.htm.
- URETSKY BF, MURALI S, REDDY PS, RABIN B, LEE A, GRIFFITH BP, HARDESTY RL, TRENTA A UND BAHNSON HT (1987) Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation* **76**: 827-834.
- VAN GELDER T, HILBRANDS LB, VANRENTERGHEM Y, WEIMAR W, DE FIJTER JW, SQUIFFLET JP, HENE RJ, VERPOOTEN GA, NAVARRO MT, HALE MD UND NICHOLLS AJ (1999) A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* **68**: 261-266.
- VAN GELDER T, KLUPP J, KAVANAU K, KORANSKY M UND MORRIS RE (in preparation) Pharmacodynamic effects of mycophenolate mofetil treatment - a study in healthy volunteers. *in preparation*.
- VAN GELDER T, KLUPP J, KAVANAU K UND MORRIS RE (2000) Novel mechanisms of action of mycophenolic acid (MPA): Inhibition of expression of CD28 and CD154 costimulatory molecules and induction of apoptosis in vivo in humans after treatment with mycophenolate mofetil (MMF). *Transplantation* **69**: S393.
- VENTURA HO, MEHRA MR, SMART FW UND STAPLETON DD (1995) Cardiac allograft vasculopathy: current concepts. *Am Heart J* **129**: 791-799.

- VU M, QI S, XU D, WU J, PENG J, DALOZE P, SEHGAL S, LEDUC B UND CHEN H (1998) Synergistic effects of mycophenolate mofetil and sirolimus in prevention of acute heart, pancreas, and kidney allograft rejection and in reversal of ongoing heart allograft rejection in the rat. *Transplantation* **66**: 1575-1580.
- WEIS M UND VON SCHEIDT W (1997) Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* **96**: 2069-2077.
- WEPPLER D, KHAN R, FRAGULIDIS G, NERY J, RICORDI C UND TZAKIS A (1996) Status of liver and gastrointestinal transplantation at the University of Miami., in *Clin Transpl* 187-201.
- WIESNER R, RABKIN J, KLINTMALM G, MCDIARMID S, LANGNAS A, PUNCH J, MCMASTER P, KALAYOGLU M, LEVY G, FREEMAN R, BISMUTH H, NEUHAUS P, MAMELOK R UND WANG W (2001) A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients. *Liver Transpl* **7**: 442-450.
- WIESNER RH (1994) Advances in diagnosis, prevention, and management of hepatic allograft rejection. *Clin Chem* **40**: 2174-2185.
- WONG KC UND LIEN-THE W (1973) *The History of Chinese Medicine*. AMS Press, New York .

VII. ANHANG

A. Abkürzungen

ADA	Adenosin Deaminase.	ConA	Concanavalin A.
ADP	Adenosindiphosphat.	CsA	Ciclosporin.
Ak	Antikörper.	dATP	Deoxyadenosintriphosphat.
AMP	Adenosinmonophosphat.	DMSO	Dimethyl-Sulfoxid.
ATP	Adenosintriphosphat.	E	% Antigen - Expression.
AUC	Area under the curve.	E ₀	Ag Expression ohne MPA bzw. vor Beginn der MMF Behandlung.
AUE	Area under pharmacodynamic effect time curve.	EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor = NO.
bFGF	Basic Fibroblastic Growth Factor.	ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1 (E-Selektin).
BID	Bis In Die.	ET-1	Endothelin - 1.
BN	Brown-Norway Ratten.	FITC	Fluorescein Isocyanat.
CD	Cluster of differentiation.	FS	Forward Scatter.
C _{max}	Spitzenkonzentration in Blut/Plasma.	GDP	Guanosindiphosphat.
CMC	Natriumcarboxymethylcellulose.	GMP	Guanosinmonophosphat.
CMM	Carboxymethyl-Morpholin.	GTP	Guanosintriphosphat.

HEM	Hydroxyethyl-Morpholin.	IONO	Ionomycin.
HEMNO	Hydroxyethyl-Morpholin N-oxide.	IV	Intima Volumen.
HGPRTase	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase.	IVUS	intravaskulärer Ultraschall.
HMG-CoA	3-hydroxy-3methylglutaryl Coenzym A.	KG	Körpergewicht.
HPLC	High pressure liquid chromatography.	LA	Lumen Area = Lumenfläche.
HTX	Herztransplantation.	LDL	Low Density Lipoprotein.
I	% Inhibition.	LEW	Lewis Ratten.
IA	Intima Area = Intimafläche.	LPS	Lipopolysaccharid.
IC ₅₀	Konzentration bei der 50% des maximalen inhibitorischen Effektes erreicht wird.	LV	Lumen Volumen.
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule 1.	MLR	Mixed Leukocyte Reaction.
IFN	Interferon.	MMF	Mycophenolate Mofetil.
IL	Interleukin.	MPA	Mycophenolsäure.
IMP	Inosinmonophosphat.	MPAG	Mycophenolat-Glucuronidat.
IMPDH	Inosinmonophosphat- Dehydrogenase.	MTD	maximal tolerierte Dosis.
		NO	Stickstoff Monoxid = EDRF.
		PBS	Phosphate Buffered Saline.
		PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen.

PCP	Peridinin chlorophyll Protein.	SMC	Smooth Muscle Cells = Glatte Muskelzellen.
PD	Pharmakodynamik.	SS	Sideward Scatter.
PDGF	Platelet Derived Growth Factor.	TGF	Tumor Growth Factor.
PE	Phycoerythrin.	Th2	T Helfer Zellen Subset 2.
PECy5	Phycoerythrin-Cyanin-5.	t _{max}	Zeitpunkt der höchsten Medikamentenkonzentration.
PGA	Phenolphthaleinglukuronsäure.	TNF	Tumor Nekrose Faktor.
PHA	Phytohemagglutinin.	Tox	Toxikologie.
PI	Propidium-Jodid.	Transplantat-Vaskulopathie.	
PK	Pharmakokinetik.	TxB2	Thromboxan B2.
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat.	VA	Vessel Area = Gefäßfläche.
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat.	VBDS	vanishing bile duct syndrom.
PWM	Pokeweed Mitogen.	VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1.
QD	Quaque Die = einmal täglich.	VV	Vessel Volume = Gefäßvolumen.
SEM	Standard Error of the Mean.		

B. Liste der Tabellen

Tabelle 1: Zusammenfassung der pharmakodynamischen Unterschiede zwischen der 10 mg/kg MMF QD und der 5 mg/kg MMF BID Gruppe; Während sich an pharmakokinetischen Parametern nur die MPA-AUC ₁₂₋₂₄ nicht aber die AUC ₀₋₂₄ unterschied, führte die Aufteilung der MMF Gesamtdosis in zwei Einzeldosen zu einem signifikant höherem pharmakodynamisch, gemessenen immunsuppressiven Effekt über den gesamten 24 Stunden Zeitraum (Student's T-Test, Signifikanzniveau 0,05).....	62
Tabelle 2: Korrelationen zwischen Schwere der Rejektion, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern 7 Tage nach heterotoper Herztransplantation und MMF Therapie im Rattenmodell.....	63
Tabelle 3: Demographie der Aortentransplantations-Studie. Die Tiere C1 und C4, C2 und C6, C3 und C5, Rx1 und Rx4, Rx2 und Rx6, sowie Rx3 und Rx5 dienten jeweils als Paare für die Transplantation.	75
Tabelle 4: Nebenwirkung der MMF Therapie für jedes Tier individuell aufgeführt: Dargestellt ist die Anzahl der Tage, an denen die unerwünschte Wirkung auftrat bzw. mittels Gavage zugefüttert wurde.	81
Tabelle 5: Blutbild und Laborchemie in Kontroll- und MMF-Gruppe Tag 42 und 105.	82
Tabelle 6: Individuelle Unterschiede im PK/PD Zusammenhang in vivo nach Aortentransplantation; E _{min} bezeichnet die berechnete, niedrigste mögliche PCNA Expression bei MPA = ∞	89
Tabelle 7: Semiquantitatives Grading der histologischen Veränderungen nach Aortentransplantation. Grad 0: kein Anhalt für TVP; Grad I: minimale Intimaverdickung; Grad II: geringgradige Veränderungen; Grad III: mittelgradige Veränderungen; Grad IV: schwere Veränderungen der TVP.	98
Tabelle 8: Korrelation zwischen MLR, Ischämiezeit, MMF Dosis, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie. In der MMF Behandlungsgruppe korrelierten MLR, mittlere MMF Dosis und das Erreichen des 95% E _{min} der Lymphozytenproliferationsrate im peripheren Blut mit der Intimahyperplasie statistisch signifikant.	104

C. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: St. Cosmas und St. Damian praktizierten die Kunst des Heilens im Hafen Aegea, heute Ayasb (Türkei). Das Wunder des schwarzen Beines beschreibt die erfolgreiche Transplantation eines Beines von einem äthiopischen Mohren auf den Römer Justinian, der seine Extremität aufgrund eines Ganggräns oder einer Geschwulst verlor. Der Legende nach konnte der Mann bereits am nächsten Tag zum Grab des Mohren laufen.....*6
- Abbildung 2: Joseph E. Murray führt am 23.12.1954 in Boston die erste erfolgreiche Nierentransplantation durch.*7
- Abbildung 3: Patienten- (a) und Organüberleben (b) nach Lebertransplantation an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Klinikums Charité – Campus Virchow von 1988 bis heute.*9
- Abbildung 4: Risikofaktoren, Pathogenese und Mediatoren der chronischen Rejektion (modifiziert nach Fellstrom et al., 1999). Abkürzungen siehe Text13*
- Abbildung 5: Metabolismus von Mycophenolat Mofetil (MMF). MMF, biologisch inaktiv, wird rasch und vollständig zur aktiven Wirksubstanz Mycophenolsäure (MPA) hydrolysiert. Der Abbauprozess erfolgt durch Glucuronisierung zu MPAG (Mycophenolat-Glucuronid). Die Morpholingrouppe von MMF ist biologisch inaktiv und wird als Hydroxyethyl-Morpholin (HEM), Hydroxyethyl-Morpholin N-oxid (HEMNO) und Carboxymethyl-Morpholin (CMM) hauptsächlich über den Urin ausgeschieden.....15*
- Abbildung 6: Verschiedene Synthesewege des Purinmetabolismus. Da der Wiederverwertungs-Stoffwechsel („Salvage-Pathway“) zur Herstellung von Guanodinmonophosphat in aktivierten Lymphozyten nicht ausreicht, sind diese Zellen von der de-novo-Synthese abhängig. MPA hemmt hierbei das Schlüsselenzym IMPDH und ist somit ein Lymphozyten-spezifisches Immunsuppressivum. (PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat; IMP: Inosidinmonophosphat; AMP: Adosidinmonophosphat; ADP: Adosindiphosphat; ATP: Adosintriphosphat; ADA: Adosin Deaminase; dATP: Deoxyadenosintriphosphat; IMPDH: Inosidinmonophosphat-Dehydrogenase; GMP: Guanodinmonophosphat; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; HGPRTase: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase). (Modifiziert nach Allison und Eugui, 1994).17*
- Abbildung 7: Studien Design. Die Studien 101 und 102 wurden im Rattenmodell und die Studien 201 und 202 im Primatenmodell durchgeführt. Sie dienen der Vorbereitung zur Aortentransplantations-Studie 301, um die MMF - Dosis, - Formulierung und - Administration zu optimieren. Ferner wurden die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Methoden im Primatenmodell etabliert. (PK: Pharmakokinetik; PD: Pharmakodynamik; LEW: Lewis Ratten; BN: Brown-Norway Ratten, HTX: Herztransplantation; Tox: Toxikologie23*
- Abbildung 8: Design Studie 101. Verglichen wurde die einmal tägliche (QD) mit der zwei mal täglichen (BID) Gabe von MMF in einer PK/PD Studie an nicht transplantierten Lewis Ratten über 36 Stunden. In den QD Gruppen A, C und E erfolgte eine einmalige MMF Gabe morgens um 8:00 Uhr, in den Gruppen B und D die Gabe um 8:00 und 20:00 Uhr. Dosierungsangaben in mg/kg. V: Vehikel – Methylcellulose-Lösung24*
- Abbildung 9: Design Studie 102. Heterotope Herztransplantation von BN zu Lewis Ratten. Die Nachbeobachtungsdauer betrug 7 Tage. Vor der Transplantation und am Tag 6 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Blut für die PK und PD Untersuchungen entnommen und mit der Histologie an Tag 7 verglichen. Die Studie umfasste zwei Gruppen mit je 6 Tiere, die mit einer Gesamt-Tagesdosis von 10 mg/kg MMF behandelt wurden. (5 mg/kg BID vs. 10 mg/kg QD). Die Studie prüfte die Frage, ob die tierexperimentelle übliche QD Gabe von MMF eine niedrigere Effektivität zur klinisch üblichen BID Gabe aufzeigt.26*
- Abbildung 10: Heterotope Herztransplantation nach Ono (Ono und Lindsey, 1969) im Rattenmodell. Die Aorta (Ao) des Spenderherzens wird mit der Aorta abdominalis des Empfängers anastomosiert und über diese Verbindung mit arteriellem Blut versorgt. Das aus dem Sinus coronarius (SC) kommende Blut fließt über den rechten Vorhof (RA) und den rechten Ventrikel (RV), die Pulmonalarterie (PA) in die Vena cava inferior des Empfängers. (Modifiziert nach Chapman et al., 1994).31*
- Abbildung 11: Orthotope Aortentransplantation im Primatenmodell. Ein 3 cm langes infrarenales Segment wird zwischen zwei blutgruppen-identischen, aber histo-inkompatiblen Tieren transplantiert. Hierbei dient jedes Tier gleichzeitig als Spender und Empfänger.....32*
- Abbildung 12: Operationssitus bei Aortentransplantation. Anastomosen sind mit Pfeilen markiert: a) Durch die Eigenelastizität der Aorta kommt es nach Explantation des Transplantates (Tx) zu einer erheblichen*

<i>Streckendifferenz. Der Stern (*) markiert die Gefäßklemmen auf den beiden Iliacal-Arterien und die mit einer Bulldog-Klemme versorgte Schwanzarterie. VC: Vena cava. b) Situs nach Reperfusion.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 13: Intravaskulärer Ultraschall. Die Femoralarterie wird freigelegt (a) und eine 5F Schleuse eingeführt. Über diese wird ein 2,6F Ultraschallkatheter (b) in die Aorta vorgeschoben und der Scan wird unter kontinuierlichem Rückzug (0,5mm/sec) auf ein S-VHS Videoband aufgezeichnet. c) Verschluß der Arteriotomie mit Prolene 7-0 Einzelknopfnähten</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 14: Computerbild der mit Echoplaque® 3-D digitalisierten IVUS-Bilder. Zwischen den manuell bestimmten Flächen für Intima, Lumen und Gefäß interpoliert das System die Zwischenwerte um so eine planare longitudinale Gefäßdarstellung zu berechnen. Rot, die nachgezeichnete Membrana interna elastica, gelb die Grenze der Intima zum Gefäßlumen.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 15: Nekropsie und Darstellung des Aortentransplantates (Tx). Truncus coeliacus (TC), A. mesenterica superior (SMA), rechte (ARd) und linke Nierenarterie (ARs), sowie A. iliaca communis (AICs) links und rechts werden vor der in situ Perfusion unterbunden.</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 16: Ex vivo Perfusion mit 10% Formalin Lösung für 18 Stunden mit einem intravasalen Druck von 100 mm Hg um eine Schrumpfung des Transplantates zu vermindern und somit eine möglichst exakte morphometrische Vermessung zu ermöglichen.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 17: Pharmakodynamische Messungen der MMF Aktivität. In vitro wird Vollblut mit unterschiedlichen Konzentrationen von MPA versetzt, in vivo wird nach MMF Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten Vollblut entnommen. Nach mitogener Stimulation werden Aktivierung und Proliferation verschiedener Leukozyten mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt.</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 18: Analyse der mononucleären Proliferationsrate mittels Durchfluss-Zytometrie. a) FS/SS Scatter; 76% der Zellen wurden für die weitere Analyse (b) mit einbezogen. Hier wurden Zelldoublets und weiterer Debris aussortiert und die verbleibenden Zellen (89,5%) für die Bestimmung der Proliferationsrate benutzt. c) Unstimulierte unbehandelte Negativ - Kontrolle. Als proliferierende Zellen wurden solche gewertet die FITC-antiPCNA positiv und SG2M positiv sind (1,37%). Nach ConA Stimulation (d) proliferierten 28,5% der Zellen (Positiv - Kontrolle, E₀). Bei Zugabe von 0,5 mg/l MPA (e) reduzierte sich die Proliferation um ca. 50% auf 14.1% (≈ IC₅₀) und bei einer Konzentration von 1,0 mg/l MPA (f) war die Proliferation fast vollständig gehemmt (3,5%).....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 19: Bestimmung der Expression von Zelloberflächen Antigenen hier am Beispiel von CD25, dem Rezeptor von IL-2. Im FS/SS Scatter zeigen die Lymphozyten eine typische Morphologie im unstimulierten (a) und ConA stimulierten (b) Blut. Hieraus werden die Zellen für die weitere Analyse verwendet. Nach Subtypisierung im Histogramm auf CD3⁺ Zellen (c) wird die CD25 Expression bestimmt (d): Grau dargestellt das Ergebnis der unstimulierten Zellen (Negativ - Kontrolle), blau die stimulierten, unbehandelten Zellen (Positiv - Kontrolle) und rot stimulierte und mit 0,5 mg/l MPA inkubierte Zellen.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 20: Sigmoidales pharmakodynamisches Modell zur Berechnung von IC₅₀ und I_{max}.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 21: MPA Plasmaspiegel nach ein- bzw. zweimaliger oraler MMF Gabe in Lewis Ratten. Die MMF Gabe erfolgte nach den 0h und 12h Blutentnahmen. QD (Quaque Die) = einmal täglich, BID (Bis In Die) = zweimal täglich. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung des Standardfehlers verzichtet.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 22: Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve 0-24h (AUC₀₋₂₄) als Parameter der MPA Exposition über einen Tag. Die AUC zeigte sich in Abhängigkeit von der Gesamt-Tagesdosis und nicht in Abhängigkeit vom Dosierungsintervall.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 23: Mittlere MPAG Plasma Konzentrationen nach eintägiger Behandlung von Lewis Ratten mit MMF. In den QD Gruppen wurde MMF nach den 0h und in den BID Gruppen nach den 0h und 12h Blutentnahmen oral verabreicht. Wie bei den MPA Spiegeln entsprachen die Kurven in den ersten zwölf Stunden der Höhe der Erstdosis. Nach der Zweitgabe in den BID Gruppen lagen dann die jeweiligen BID Kurven höher als die der Gesamt-Tagesdosis entsprechenden QD Kurven.</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 24: Hemmung der Proliferation von mononukleären Zellen nach der Gabe von MMF dargestellt als PCNA⁺/SG2M⁺ Zellen. Alle Werte wurden zu dem Nullwert vor Behandlungsbeginn normalisiert</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 25: MPA Plasma-Spiegel an Tag 6 nach heterotoper Herztransplantation im Rattenmodell. Während den ersten 12 Stunden waren die MPA Spiegel in beiden Gruppen vergleichbar, unterschieden sich dann aber nach dem 12h Zeitpunkt.....</i>	<i>58</i>

- Abbildung 26: MPA - AUC nach 6 Tagen MMF Therapie. Während bei gleicher Tagesdosis die Gesamt-AUC in beiden Gruppen identisch war, kam es durch Aufteilung der Gesamtdosis in 2 Einzeldosen zu einer signifikanten Erhöhung der AUC₁₂₋₂₄ in der 5 mg/kg MMF BID Gruppe.....59
- Abbildung 27: Lymphozyten – Proliferationshemmung durch MMF. Auch nach 6 Tagen Therapie war die MMF Wirkung rasch reversibel. Zum Zeitpunkt des MPA Talspiegels war die PCNA Expression in Zellen, die sich in ihrer S, G₂ oder M Phase des Zellzyklus befanden, in der 10 mg/kg QD Gruppe nur noch um 14% reduziert...60
- Abbildung 28: Expression des Transferrin Rezeptors CD71 auf T Lymphozyten. Während die Behandlung mit 10 mg/kg MMF QD zu einer insuffizienten Immunsuppression in der zweiten Hälfte des Dosierung - Zeitraumes führte, resultierte aus der Gabe von 5 mg/kg MMF BID eine mindestens 50% Reduktion der CD71 Expression zu allen Zeitpunkten.....61
- Abbildung 29: Zusammenhang zwischen den pharmakodynamischen Effekten von MMF und der Schwere des Rejektionsgrades in der Histologie nach heterotoper Herztransplantation im BN – LEW Rattenmodell. Die Abbildungen a) bis c) sind repräsentativ für die 10 mg/kg MMF QD Gruppe, die Abbildungen d) bis f) für die 5 mg/kg MMF BID Gruppe. Nach ConA Stimulation korrelierten zum Zeitpunkt der MPA-Plasma-Talspiegel (E₀) die Proliferationsrate (a + d), dargestellt als PCNA⁺/SG₂M⁺ Zellen, und die Expression von CD71⁺ auf OX52⁺ Zellen (b + e) mit dem Rejektionsgrad (c: Grad 2; f: Grad 1) in der Histologie (HE Färbung, Vergrößerung 100 - 400x)64
- Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Studie 201. Für jeden Cynomolgus Affen (P1 – P4) ist ein eigener Graph angelegt, der die individuelle orale MMF Dosis (QD) und die Toxizitätszeichen zeigt. Alle Tiere hatten Gewicht verloren und zeigten eine Diarrhoe. Daher wurde in den Tieren P2 und P3 nach 14 Tagen, und in den restlichen Tieren nach 3 Wochen die initiale Dosis reduziert. Bei P3 mußte die MMF Therapie für einen Tag pausiert werden. Nach Absetzen der Therapie erholten sich alle Tiere rasch.65
- Abbildung 31: Erstgabe von 100 mg/kg MMF oral in Form einer MMF Pulver Suspension in Vehikel Lösung. Die Tiere zeigten große Unterschiede in den erzielten MPA Spiegeln.67
- Abbildung 32: Individuelle MPA Plasmaspiegel nach 7 Tagen oraler MMF Therapie (100 mg/kg QD) zeigte ein Fortbestehen der hohen inter-individuellen Variabilität.67
- Abbildung 33: Individuelle MPA Plasmaspiegel am Tag 28 der Studie 201, nach 7 Tagen Therapie mit 50 mg/kg MMF QD.68
- Abbildung 34: Vergleich von den oralen MMF Dosisgruppen 50 mg/kg QD und 100 mg/kg QD; oben MPA Plasmaspiegel und unten die Lymphozyten-Proliferationsrate gemessen anhand der SG₂M Expression. Während die höhere Dosis zwar zu sehr variablen MPA Plasmaspiegeln, aber zu einem maximalen immunsuppressiven Effekt über den 24 Stunden Zeitraum führte, waren die niedrigeren Plasmaspiegel in der 50 mg/kg QD Gruppe mit einer submaximalen Inhibition der Lymphozytenproliferation vergesellschaftet.70
- Abbildung 35: Erstapplikation von 50 mg/kg CellCept-IV[®] BID subkutan am Primaten. Effektive MPA Plasmaspiegel wurden innerhalb von 2 Stunden erreicht.72
- Abbildung 36: MMF Pharmakokinetik nach 14 Tagen 50 mg/kg CellCept-IV[®] subkutaner BID Therapie. Gleichmäßige MPA Plasmaspiegel.....73
- Abbildung 37: MPA Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 50 mg/kg CellCept-IV[®] BID. Tier P6 zeigte nur minimale Spiegel, während die anderen Tiere anscheinend eine gute Resorption aufwiesen. Die Plasmaspiegel zeigten jedoch eine höhere Variabilität als nach subkutaner Applikation.74
- Abbildung 38: Tier Rx1: Rekonstruktion der Aortenbifurkation, nachdem die zunächst durchgeführte End-zu-End-Aorto-Aortostomie zu einer Dissoziation der Iliacalgefäße führte. Zur Vermeidung einer Abgangsstenose wurde eine End-zu-End-Anastomose zwischen Transplantat (Tx) und A. iliaca communis sinistra (AICs) durchgeführt und anschließend die rechte Iliacal-Arterie (AICd) End-zu-Seit (E-S) implantiert. Die Pfeile markieren die Anastomosen. VC: Vena cava.76
- Abbildung 39: Dünndarm Invagination (Tier Rx1). a) Operationsitus: etwa 30 cm vor der Bauhin' Klappe war das terminale Ileum bis ins Colon ascendens invaginiert und hatte zu einem Darmverschluß mit Ischämie des terminalen Ileums geführt. Am Resektat (b) zeigte sich eine polypöse Raumforderung als Ursache (Inlay). c) Bei Versuchsende stellte sich die Anastomose reizlos, ohne Stenose und mit Omentum majus abgedeckt dar.77

Abbildung 40: Individuelle tägliche MMF Gesamtdosis verabreicht in zwei Einzeldosen. Die Dosierung richtete sich nach Toxizität, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern.....	78
Abbildung 41: Gewichtsverlauf nach Aortentransplantation. Nach initialer Gewichtszunahme nach Tx nahmen die Tiere in der Therapiegruppe nach Beginn der MMF Therapie wieder an Gewicht ab.....	79
Abbildung 42: Individueller Gewichtsverlauf in der Therapiegruppe. Die Tiere zeigten eine sehr unterschiedliche Sensitivität für die MMF Toxizität.....	80
Abbildung 43: Individuelle MPA Plasma Talspiegel nach MMF Therapie zwischen Tag 45 und 103 nach Aortentransplantation.....	83
Abbildung 44: Korrelation zwischen in vitro MPA Konzentration und PCNA Expressionshemmung in SG ₂ M Zellen (IC ₅₀ : 0,48 mg/l (0,3 – 0,61 mg/l; I _{max} : 91,86 ± 4,5 rel%; r ² =0,95), gemessen an den 6 Tieren der Behandlungsgruppe vor Beginn der MMF Therapie an Tag 42 nach Transplantation.	84
Abbildung 45: In vitro Einfluss von MPA auf Zelloberflächen-Antigene auf CD3 ⁺ Zellen in 6 Cynomolgus Affen (R _{x1} -R _{x6}) vor Beginn mit der MMF Therapie. Zur Erhaltung der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken verzichtet; Einzelheiten im Text.	85
Abbildung 46: Intrazelluläre Expression von IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ in CD3 ⁺ Zellen. MPA hat keinen Einfluss auf die Zytokin - Expression in vitro.....	86
Abbildung 47: Einfluss von MPA auf die Monozyten- und B Zellfunktion in vitro. Die intrazelluläre TNF- α Expression in CD14 ⁺ Zellen und die CD69 bzw. CD86 Expression in CD20 ⁺ Zellen bleibt auch bei steigender MPA Konzentration konstant.....	86
Abbildung 48: Vergleich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von MMF. Die MPA Plasma Talspiegel zeigten eine höhere Streuung als die korrespondierenden Lymphozyten-Proliferationsraten.....	87
Abbildung 49: Individuelle Bestimmung der Lymphozytenproliferation jeweils zum Zeitpunkt vor der nächsten MMF Gabe. Schon nach der initialen MMF Gabe wurde die PCNA Expression gehemmt und zeigte im Vergleich zu den MPA Plasmaspiegeln nur eine mäßige Variation. Am Tag 105, zwei Tage nach der letzten MMF Gabe, hatten sich die Werte noch nicht vollständig normalisiert.....	88
Abbildung 50: Pharmakodynamisch – pharmakokinetische Beziehung in vivo zwischen der PCNA/SG ₂ M Expression und den MPA Plasmaspiegeln in Cynomolgus Affen nach Aortentransplantation. Die geringe Anzahl von MPA – Konzentrationen von weniger als 2 mg/l verhinderten eine valide Bestimmung des IC ₅₀	89
Abbildung 51: Mittleres Gefäßvolumen ± SEM im Aortentransplantat. Nur in der Kontrollgruppe und nicht in der Therapiegruppe fiel das Gefäßvolumen von Tag 21 zu Tag 105 signifikant ab (p = 0,02). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.	91
Abbildung 52: Individuelle Entwicklung der Gefäßvolumina von Tag 21 bis Tag 105 in Kontroll- und MMF-Gruppe.	92
Abbildung 53: Mittlere Lumenfläche im Aortentransplantat. Um Einflüsse der Anastomose zu vermeiden bezog sich die Messung auf das mittlere 1cm-Segment. In beiden Gruppen nahmen die Lumina signifikant ab.....	93
Abbildung 54: Individuelle Entwicklung der Gefäßflächen in der IVUS Untersuchung.....	94
Abbildung 55: Entwicklung der mittleren Intimahyperplasie, dargestellt anhand der IVUS Messung des Intimavolumens [mm ³], an den Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 nach Aortentransplantation. Die Messungen fanden im mittleren, 1 cm langen Segment des Transplantates statt, um nicht dem Einfluss der Anastomosen zu unterliegen. In der allgemeinen Auswertung mit dem GLM Modell wiederholter Messungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (p = 0,3).	95
Abbildung 56: Entwicklung der mittleren Intimahyperplasie, dargestellt anhand der IVUS Messung des Intimavolumens [mm ³], an den Tagen 21, 42, 63, 84 und 105 nach Aortentransplantation. Die Messungen fanden im mittleren, 1 cm langen Segment des Transplantates statt, um nicht dem Einfluss der Anastomosen zu unterliegen. In der allgemeinen Auswertung mit dem GLM Modell wiederholter Messungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (p = 0,3).	96

-
- Abbildung 57: Intimahyperplasie in der Kontrollgruppe an Tag 105 nach Aortentransplantation. Ohne jegliche Immunsuppression entwickelte sich eine signifikante Verdickung der Intima, die im histologischen Bild der Transplantat-Vaskulopathie im Menschen entspricht. α -Actin-Färbung ($\times 20 - \times 30$) zur Darstellung der glatten Muskelzellen.....99*
- Abbildung 58: Histologie der Aortentransplantate in der MMF Behandlungsgruppe. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhielten die Tiere der Therapie Gruppe vom 45. Tag nach Transplantation an MMF zur Behandlung der bereits fortgeschrittenen Transplantat-Vaskulopathie (TVP). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe entwickelte sich hier die TVP nicht in allen Tieren gleichmäßig: Während R \times 1 – R \times 4 die MMF Therapie gut tolerierten und eine geringere Intimahyperplasie als die Tiere in der Kontrollgruppe aufwiesen, zeigten die Tiere R \times 5 und R \times 6 bei schlechter MMF Verträglichkeit eine ungehinderte Entwicklung der Intimaverdickung. α -Actin-Färbung ($\times 20 - \times 30$) zur Darstellung der glatten Muskelzellen..... 100*
- Abbildung 59: Histomorphometrische Bestimmung der mittleren Lumen-, Intima- und Mediaflächen im mittleren Segment des Aortentransplantates. Im Mittel (\pm SEM) erreichten die Unterschiede zwischen der Kontroll- und der MMF Gruppe für die Fläche der Intima ($p = 0,078$) und die Fläche der Media ($p = 0,016$) Signifikanzniveau. Allerdings waren die Messungen durch die postmortale elastische Schrumpfung der Gefäße im Vergleich zur IVUS-Morphometrie nur eingeschränkt verwertbar..... 101*
- Abbildung 60: Korrelation zwischen dem Stimulationsindex der „Mixed Leucocyte Reaction“ und der Intimahyperplasie gemessen anhand des Intimavolumens an Tag 105 nach Aortentransplantation 103*
- Abbildung 61: Korrelation zwischen der mittleren MMF Dosis pro Tag und dem Ausmaß der Transplantat-Vaskulopathie..... 105*

D. Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

E. Lebenslauf

ADRESSE

Kurhausstr. 36A

D – 13467 Berlin

Telefon: 030/40009633

Fax: 030/40009634

e-mail: jochen@klupp.com

KLINIKSSADRESSE

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Charité - Campus Virchow

Humboldt Universität zu Berlin

Augustenburger Platz 1

D – 13353 Berlin

Telefon: 030/450-552001

Fax: 030/450-552900

e-mail: jochen.klupp@charite.de

GEBURTSTAG UND - ORT

4. Juli 1964

Frankenthal /Pfalz,

STAATSANGEHÖRIGKEIT

Deutsch

RELIGION

Evangelisch

AUS- UND WEITERBILDUNG

Universität Karlsruhe

Studium der Physik

1983

Johannes Gutenberg Universität Mainz

Studium der Medizin

1984 – 1990

FAMULATUREN:

Kreiskrankenhaus Frankenthal/Pfalz

Prof. Dr. med. J. Reiter

Chirurgie

August 1986

Dr. B. Miketta Frankenthal/Pfalz

Chirurg und Unfallchirurg

August 1987

USAF Regional Medical Center Wiesbaden

Col. J.M. Seaman, M.D.

Innere Medizin

Februar 1988

Pacific Presbyterian Medical Center San Francisco / U.S.A

Th. R. Russell M.D.

Chirurgie

August 1988

ARZT IM PRAKTIKUM UND CHIRURGISCHE WEITERBILDUNG:

Johannes Gutenberg Universität Mainz

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Th. Junginger

Dezember 1990 – Januar 1995

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität

Charité – Campus Virchow

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. P. Neuhaus

Februar 1995 bis September 1998

ABSCHLÜSSE UND PRÜFUNGEN

Hochschulabschluß

21. Juni 1983

Ärztliche Prüfung

15. November 1990

Promotion zum Doktor der Medizin

6. Januar 1992

Approbation als Arzt

1. Juni 1992

Facharzt für Chirurgie

5. Mai 1998

WISSENSCHAFTLICHE UND KLINISCHE TÄTIGKEIT

Stanford University

Dept. of Cardiothoracic Surgery

Transplantation Immunology

Prof. Randall E. Morris, M.D.

(DFG KL1214/1-2)

Oktober 1998 bis September 2000

Humboldt Universität zu Berlin

Charité – Campus Virchow

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. med. P. Neuhaus

seit Oktober 2000

MITGLIEDSCHAFTEN

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie

seit 1995

International Transplant Society

seit 1998

Deutsche Transplantationsgesellschaft

seit 1998

American Society of Transplantation

seit 2002

F. Danksagung

Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. med. P. Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité - Campus Virchow Klinikum Berlin, danke ich für seine immerwährende und großzügige Unterstützung und Förderung meiner klinischen, chirurgischen und wissenschaftlichen Ausbildung. Ohne diesen nötigen Rückhalt hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. R. E. Morris, Direktor der Transplantations-Immunologie der Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie der Stanford Medical School, Stanford, USA, für seine exzellente Beratung und Unterstützung bei den Forschungsprojekten. Die stets inspirierenden und aufmunternden Diskussionen und seine zahlreichen Anregungen haben wesentlich zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden aus dem Forschungslabor der Transplantations-Immunologie in Stanford. Stellvertretend für all die Anderen sei hier Herrn Dr. Teun van Gelder, Universitäts Hospital Rotterdam, NL, Herrn Dr. Camille Dambrin, Kardiovaskuläre Chirurgie, Toulouse, Frankreich und Frau Randi Shorthouse, Stanford, USA für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei der Gestaltung und Durchführung der Experimente gedankt.

Ebenso geht mein großer Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Langrehr für seine jahrelange, freundschaftliche Unterstützung meiner Forschungstätigkeiten. Als stets anregender Gesprächspartner hat er mich auf meinem Weg begleitet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für ihre großzügige Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes in Stanford gedankt (DFG Kl 1214 / 1 bis 2). Teile dieser Studie wurden von Roche Pharmaceutical Inc., Nutley, USA, der Hedco Foundation und dem Ralph und Marian Falk Trust finanziert.

Frau Prof. Dr. M. Billingham und Herrn Dr. G. Berry, Institut für Pathologie, Stanford Medical School, Stanford, USA, danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der histologischen und immunhistologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. U. Christians und Herrn Dr. W. Jacobsen, Institut für klinische Pharmakologie der UCSF Medical School, San Francisco, USA, danke ich für die Hilfe bei der Analyse der MPA- und MPAG-Blutspiegelbestimmungen. Frau Dr. Elsie M. Eugui, Roche Bioscience, Palo Alto, USA danke ich ganz besonders für ihre kompetente Beratung bei der Entwicklung des Studien-Designs.

Herrn Dr. Kiyoshi Hibi und Herrn Dr. Takeshi Suzuki, sowie den Kollegen der Abteilung für Kardiologie der Stanford Medical School, Stanford, USA danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der IVUS Untersuchungen und den kompetenten morphometrischen Analysen.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinen Kollegen danke ich für die Unterstützung und dafür, dass sie mir den nötigen Freiraum schafften mich diesem Projekt widmen zu können.